A vacina

Jaime Larry Benchimol
(coord.)

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

BENCHIMOL, JL., coord. *Febre amarela*: a doença e a vacina, uma história inacabada [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2001. 470 p. ISBN 85-85676-98-1. Available from SciELO Books <http://books.scielo.org>.

All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

3

A vacina

A vacina contra a febre amarela começou a ser produzida no Rio de Janeiro com uma amostra do vírus 17D trazida de Nova York por Hugh H. Smith, em 1937. Essa amostra provinha daquele vírus extraído do africano Asibi, dez anos antes, e que viera sendo modificado por culturas sucessivas em meios diversos — macacos, mosquitos, tecido embrionário de camundongo com soros normais e heterólogos — até se chegar às passagens seriadas *in vitro*, em meio de cultura contendo tecido de embrião de galinha despojado do sistema nervoso central. A partir da subcultura 214 — contada desde o *Asibi* original —, foram iniciadas muitas séries paralelas, algumas por passagem direta em ovos embrionados. Essas séries conservavam, mais ou menos inalteradas, as características benignas para macacos e homens do vírus "camarada"[1], ainda que se verificassem pequenas variações na velocidade e intensidade de sua replicação na cultura em tecido ou em ovos embrionados.

O material trazido para o Brasil provinha de duas séries paralelas de cultura em tecido designadas como 17D e 17DD. A primeira havia sofrido 150 passagens, chegando aqui em forma dessecada. A série 17DD era a 229ª subcultura, e parte dela foi trazida sob a forma de um lote de vacina preparado em Nova York (n.º 41).

Os números indicadores dessas subculturas continuaram a crescer no Laboratório do Serviço Especial de Profilaxia da Febre Amarela, no Rio de Janeiro, à medida que iam se sucedendo as passagens do vírus *in vitro* por meio de cultura que continha tecido de embrião de galinha desnervado, ou por ovos embrionados, extraindo-se, a cada passagem, o material destinado aos lotes de vacina e a lotes que eram usados para inseminar nova rodada de ovos, e nova colheita de vacina e inóculo.

Turbulências em campo

Como vimos, a forte diminuição do poder antigênico da vacina, em 1939, foi atribuída ao número excessivo de passagens do vírus de cultura a cultura. A série com a qual se fabricava a vacina já havia ultrapassado a subcultura 300. Soper, Smith e Penna (set. 1939, pp. 351-2) fixaram em 255 o número máximo de subculturas para o material a ser utilizado na preparação de vacinas. Abaixo de 229 tampouco convinha, devido à probabilidade de reações fortes nas pessoas inoculadas. Os responsáveis pelo laboratório retrocederam a subculturas mais antigas, e as vacinações, que tinham sido suspensas por alguns meses, foram retomadas, ainda em 1939.

O surto de icterícia detectado no final daquele ano em Campos, depois no Espírito Santo, determinou nova interrupção dos trabalhos, iniciando-se um estudo de maior fôlego no laboratório e em todos os lugares onde se tinham

Imagem de abertura: A vacina de febre amarela já liofilizada. Bio-Manguinhos/ Fiocruz

praticado vacinações (Fox, Manso, Penna e Pará, 1942, pp. 68-116). Soper (1942, pp. 8-9) diz que a técnica de fabricação começou a ser modificada no segundo semestre de 1940 e Penna (1956, pp. 67-8), que as soluções finalmente adotadas no Rio de Janeiro eram uma combinação de técnicas desenvolvidas nesse laboratório e no de Nova York, onde também se fariam estudos visando a determinar a relação entre vacina e icterícia. Os leitores devem se lembrar de que as alterações visaram, sobretudo, a eliminar o soro humano de sua composição. Além de ser o principal suspeito da transmissão do agente ainda indeterminado da doença conhecida então por "hepatite do soro homólogo" ou "icterícia de inoculação", era um componente que pesava muito no custo da vacina.

Segundo Lowy (2000, p. 7), as primeiras doses, sem soro, foram aplicadas no homem em setembro de 1940, e depois do teste em São Mateus, Belo Horizonte, a vacina, preparada com nova cepa de 17D trazida de Nova York, voltou a ser produzida em grande escala.

As imunizações estavam voltando a seus índices normais em 1941, quando surgiu outro problema sério: casos de encefalite relacionados à vacina. Quando foram diagnosticados os primeiros casos na cidade de Guanhães, em Minas Gerais, foram feitas extensas investigações nos municípios vizinhos, depois em outras áreas onde se tinha aplicado a vacina. O inquérito abrangeu 55.000 pessoas: 273 (0,5%) haviam tido reações excepcionalmente severas; destas, 199 apresentaram sinais de comprometimento do sistema nervoso central. Houve um caso fatal. Tudo levava a crer que os casos de encefalite se deviam a uma mutação do vírus 17D. Tal suposição baseava-se na história de encefalite induzida por gerações passadas do vírus, e pelas evidências fornecidas pelos testes imunológicos, indicando que as vítimas das formas graves apresentavam taxas particularmente elevadas de anticorpos contra o 17D. Ele parecia ter desenvolvido maior afinidade pelo sistema nervoso humano.

Para descartar a possibilidade de que outro agente etiológico fosse o responsável pelas encefalites, os técnicos do Laboratório de Febre Amarela do Rio de Janeiro decidiram fazer um teste em Guaxupé, município mineiro situado a 120 km de Pouso Alegre, e a uma distância maior de Guanhães: lá, 19.057 pessoas foram inoculadas com doses de um lote sabidamente suspeito (E758) e com vacinas derivadas de outras subamostras do vírus 17D-NY 310, E750, E751, E752, além de um lote que não continha vírus algum, para servir de controle. Três dessas subamostras induziram reações encefalíticas (Fox, Lennette, Manso e Souza Aguiar, 1942, pp. 117-42).

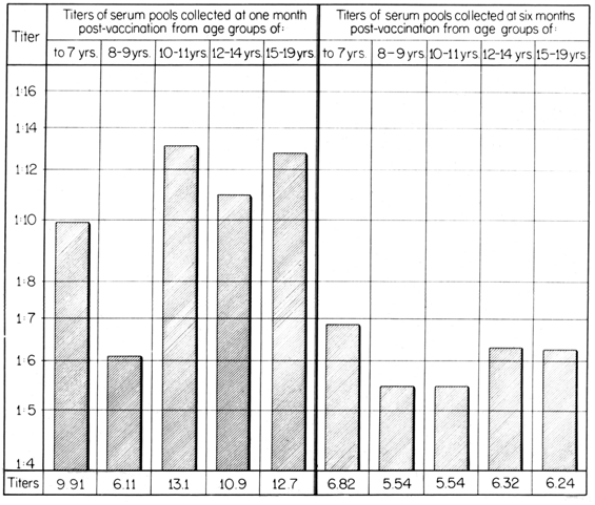


Gráfico comparativo de títulos de anticorpos de soros colhidos um mês e seis meses após a vacinação, provenientes de grupos etários diversificados em Pouso Alegre, MG. 1940.
Coc/Fiocruz

O inquérito realizado por Fox e colaboradores reforçou a decisão de se abandonar a subamostra que era usada na fabricação da vacina, mas, para fazê-lo, era preciso estudar cuidadosamente a antigenicidade das outras disponíveis, já que as falhas sérias de imunização ocorridas em 1939 tinham mostrado que podiam diferir muito quanto ao poder de suscitar resposta imunológica adequada nos indivíduos vacinados (Soper, Smith e Penna, 1939, pp. 351-3).

Dessa vez, a investigação foi conduzida em setembro de 1940, no 10º Regimento de Infantaria em Belo Horizonte, capital de Minas Gerais, mediante autorização do coronel Francisco Borges Fortes de Oliveira, chefe do estado maior do Quarto Distrito Militar. Foram vacinados 814 soldados, com o objetivo de se avaliar não apenas as potências das subamostras testadas, como a dose mínima necessária para se obter imunização adequada. Utilizaram-se quatro subamostras, cada qual representando uma série de passagens independentes a partir da cadeia primária do 17D. Três — $14D_3$, 17DD baixa e 1D-NY 104 — vinham sendo mantidas principalmente em cultura de tecidos, feita segundo a técnica original descrita por Lloyd, Theiler e Ricci (1936, pp. 481-529), ao passo que na quarta — a EP (*egg passage*) —, o vírus era cultivado por passagens sucessivas em ovos embrionados. (Pedimos paciência aos leitores: logo explicaremos o que significavam estas siglas.) As vacinas levadas ao quartel de Minas Gerais eram preparadas segundo a técnica básica originalmente descrita por Smith, Penna e Paoliello (1938, pp. 437-68), mas modificações recém-introduzidas em conseqüência dos problemas que acabamos de assinalar já tinham dado origem a duas variantes: uma vacina ainda com soro, outra sem. O estudo em Belo Horizonte mostrou que as subamostras 17D-NY 104 e EP tinham maior poder antigênico do que as demais, e assim, quando a produção foi reiniciada, em fins de 1940, a nova série de lotes preparados já sem soro foi derivada da primeira, a 17D-NY 104 (Fox, Kossobudzki e Fonseca da Cunha, setembro, 1943, pp. 113-8).

Enquanto se implantavam as novas técnicas de fabricação da vacina e o sistema de lotes semente, faziam-se novas investigações com o objetivo de esclarecer questões cruciais para a adoção definitiva dessas rotinas como procedimentos padrão da vacina contra a febre amarela.

Primeiramente, era preciso verificar se havia variações significativas no poder antigênico dos lotes de vacina irmãos, gerados a partir de lotes semente comuns. Se fosse comprovada a suposição de que eram uniformes, tornava-se desnecessária a prática de submeter-se cada lote fabricado a testes de campo antes de liberá-lo para uso geral. O segundo problema era a diluição em que deviam ser empregadas as vacinas preparadas sem soro humano. Como veremos adiante, a supressão deste componente resultou em grande elevação da concentração de vírus no suco proveniente da trituração dos embriões de galinha infectados com o 17D. As vacinas preparadas pela técnica anterior eram usadas em diluições não superiores a 1 para 20. A nova técnica permitiria manter igual concentração de vírus elevando-se a diluição até 1 para 800.

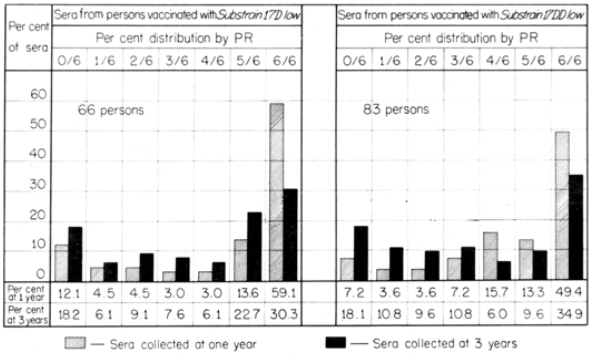

Per cent of sera
Sera from persons vaccinated with Substrain 17D low
Per cent distribution by PR
0/6 1/6 2/6 3/6 4/6 5/6 6/6
66 persons
83 persons
60
50
40
30
20
10
0
Per cent at 1 year
12.1 4.5 4.5 3.0 3.0 13.6 59.1
7.2 3.6 3.6 7.2 15.7 13.3 49.4
Per cent at 3 years
18.2 6.1 9.1 7.6 6.1 22.7 30.3
18.1 10.8 9.6 10.8 6.0 9.6 34.9
— Sera collected at one year
— Sera collected at 3 years

Gráfico demonstrando resultados de testes de proteção feitos em filhotes de camundongos, com soros colhidos em Juiz de Fora e Belo Horizonte um ano e três anos após vacinação, com duas subamostras do vírus vacínico 17D baixa s.c. e 17 DD baixa s.c. Setembro de 1942.
Foto: A. Fialho
Coc/Fiocruz

Contudo, como tinham mostrado Bauer e Mahaffy (1930, pp.175-95), diluições muito altas de um preparado viral em solução salina fisiológica resultavam em rápida inativação do vírus. Era necessário determinar o quanto se podia diluir a vacina feita a partir do suco de embrião puro, sem comprometer a 'saúde' do vírus, que precisava chegar vivo às pessoas vacinadas em campo. No laboratório, ele se mostrava relativamente estável por no máximo três horas, a 37º C, em diluições de até 1 para 100. Elevando-se as diluições a 1 para 200, deteriorava-se ainda mais rapidamente. O limite superior da

diluição para uso em campo foi fixado, assim, em 1 para 100, fosse qual fosse a concentração de vírus na vacina. Ela teria de ser feita em duas etapas: primeiro, reidratava-se a vacina a 1 para 10, depois se fazia a diluição final na própria seringa de 10 ml usada habitualmente nas vacinações em massa. Deste modo, o vírus permaneceria no meio mais diluído por cerca de cinco minutos, o tempo considerado necessário para descarregar a seringa em vinte pessoas.

Os dois problemas foram esclarecidos em dezembro de 1940 e janeiro de 1941, no município de Pouso Alegre, onde foram vacinadas 5.500 pessoas, fazendo-se estudos sorológicos pré-vacinais em 1.400 e pós-vacinais em 920. A experiência demonstrou que era idêntica a resposta imunitária aos 15 lotes de vacina preparados de acordo com o sistema de lotes semente, e demonstrou, também, que se obtinham doses eficazes de vacina sem soro, diluindo-a até 1 para 100, em solução salina, desde que contivesse adequada concentração de vírus. Subproduto importante da experiência foi a confirmação da suspeita, levantada pela equipe que investigara as encefalites, de que havia uma relação entre idade e resposta

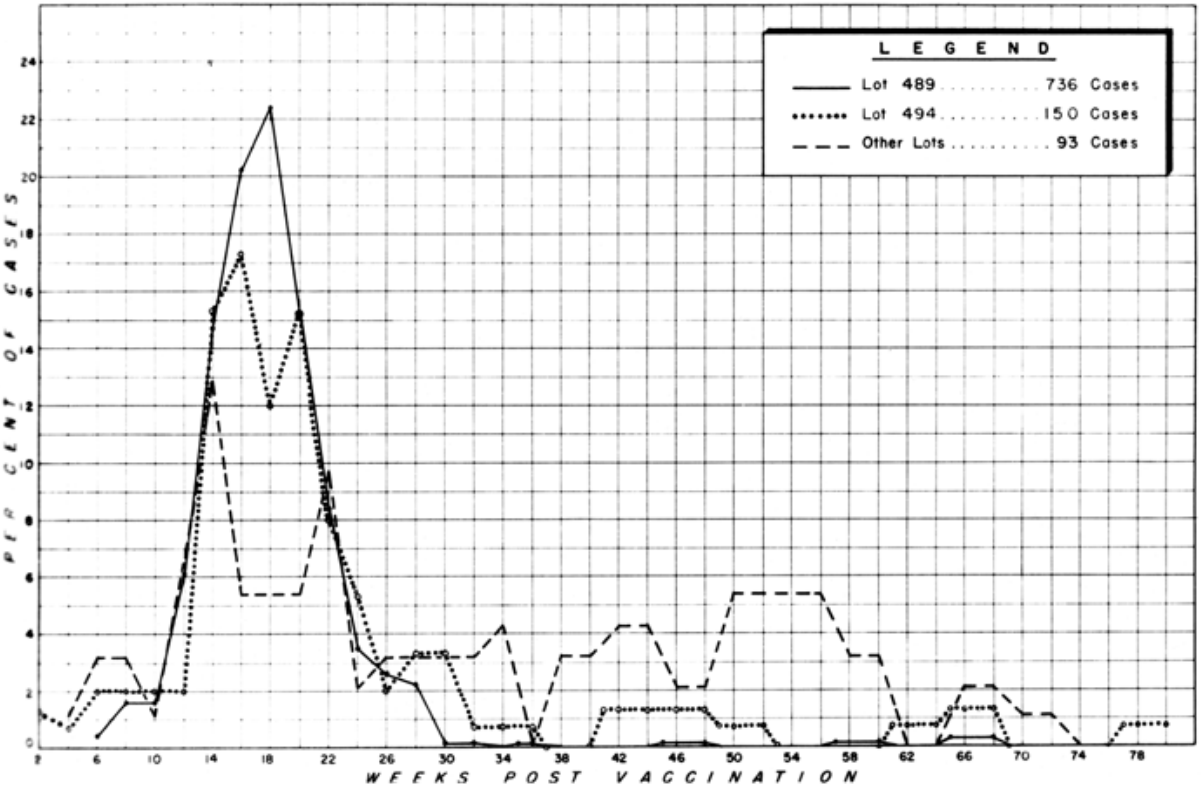


Gráfico apresentando a distribuição de casos de icterícia em vacinados com lotes 489, 494 e outros, conforme o período de incubação. Setembro de 1942.
Foto: A. Fialho
Coc/Fiocruz

imunitária ao vírus 17D: obtinham-se graus menores de proteção com freqüência maior entre indivíduos na faixa etária até 14 anos.

Em fevereiro de 1941, realizou-se outra experiência em Silvinópolis, município adjacente a Pouso Alegre. O objetivo agora era determinar a eficácia relativa de diferentes maneiras de inocular a vacina. Desde que o 17D começara a ser usado, o método padrão consistia em injetar 0,5 ml subcutaneamente. Já que não se conseguia transpor o limite de diluição estipulado acima, buscava-se saber se era possível imunizar as pessoas com volume menor de inóculo introduzido por diferentes vias no organismo humano. Se isso fosse possível, aumentar-se-ia o número de doses obtidas por unidade de volume da preparação básica, e se reduziria consideravelmente o custo do produto.

Testaram-se, então, a suscetibilidade e a resposta imune de algumas centenas de moradores de Silvinópolis ao vírus vacínico proveniente da subamostra 17D-NY 104, administrado por via intramuscular, subcutânea e intradérmica, em doses de 0,5 e 0,1 ml. Verificou-se que a suscetibilidade do homem ao vírus inoculado intradérmica ou intramuscularmente era maior, mas não houve diferenças significativas quanto à resposta imunitária imediata, nem àquela apurada um ano após a vacinação. As diferenças, portanto, não foram consideradas suficientes para sobrepujar as vantagens técnicas da via subcutânea, com inóculo de 0,5 ml.

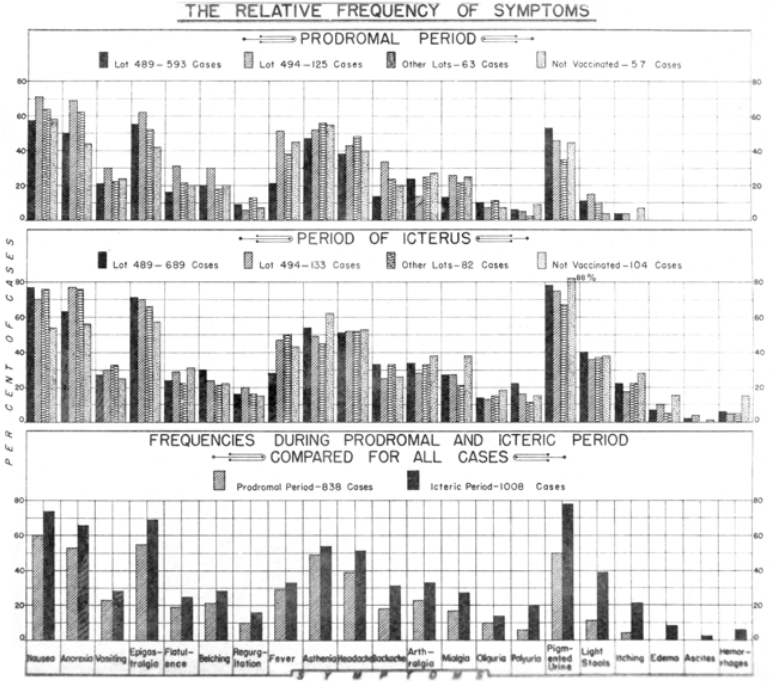


Gráfico mostrando a freqüência dos sintomas prodrômicos da icterícia nas quatro categorias de casos investigados por Fox, Manso, Penna e Pará. Coc/Fiocruz

Ingressando no laboratório: o vírus

Data desse período o esforço no sentido de padronizar a técnica de preparação da vacina e, até mesmo, os procedimentos a adotar em caso de modificação dessa técnica. Com certo atraso, determinado, sem dúvida, pelos contratempos que descrevemos acima, codificou-se no Laboratório de Febre Amarela aquela lógica taylorista de controle de tarefas, hierarquização de atribuições e maximização de resultados que regia as outras rotinas do programa de combate à febre amarela.

Segundo J. Austin Kerr e Henrique de Azevedo Penna, os autores do *Manual da vacina,* elaborado em fevereiro de 1941, a descrição detalhada das etapas de preparação da vacina tinha por objetivo "permitir a todos conhecer exatamente qual técnica foi usada na produção de cada lote". Mudanças podiam se tornar necessárias, mas não devia haver desvio, "ainda que ligeiro, da técnica padrão aprovada ... sem prévia aprovação por escrito do diretor do laboratório". Sempre que se efetuassem mudanças, elas teriam de ser descritas como revisão da técnica existente. As páginas do manual tinham a data de janeiro de 1941. As páginas revisadas receberiam os números correspondentes às páginas substituídas, anotando-se no topo a data de revisão.[2]

Este documento constitui, assim, uma excelente via para ingressarmos no laboratório e examinarmos mais de perto o modo como era fabricada a vacina. Os problemas e as soluções que se sucedem em encadeamento tão límpido nos trabalhos publicados, *a posteriori*, pelos técnicos e dirigentes do serviço e pelos historiadores da medicina, aparecem de forma mais desordenada, ou menos estável, nos registros elaborados por aqueles que suavam a camisa para manter as partes do complexo sistema funcionando adequadamente.

Verificamos, então, a partir das sucessivas revisões feitas entre janeiro de 1941 e agosto de 1942, que nesse período coexistiram técnicas diversas em certas etapas do processo e coexistiam, inclusive, três tipos de vacina: aquela ainda com soro, filtrada e sem filtragem, e a vacina sem soro e sem filtragem, em vias de prevalecer.

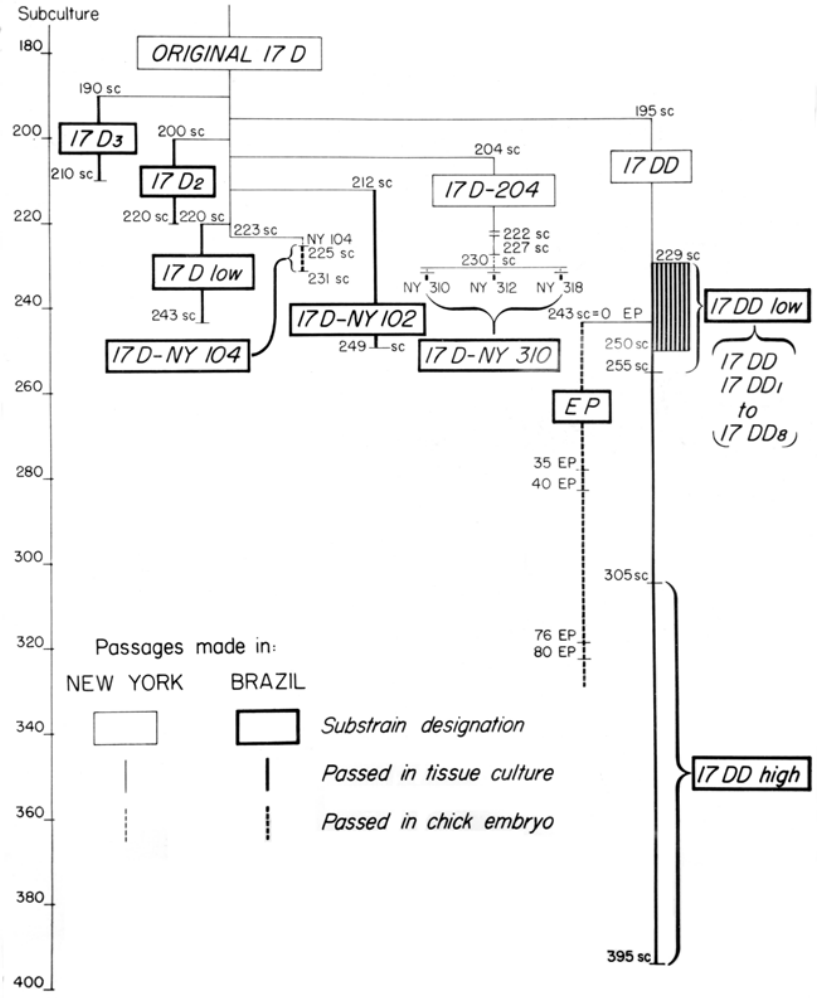
Tentaremos recuperar a história do processo de produção da vacina, combinando os dados fornecidos pelo manual de 1941 com trabalhos similares que nos fornecem 'cortes' relativos ao processo em curso em 1956 e na atualidade. Relatórios, diários e artigos publicados pelos técnicos que lidaram com a vacina, especialmente Henrique de Azevedo Penna, nos mostram a dinâmica da implementação de novas soluções, com os ensaios e erros, os becos sem saída, no tempo decorrido entre a fixação das sucessivas técnicas padrão.

Até a implantação definitiva do sistema de lotes semente, em 1944, a seleção, importação e replicação das cepas, também chamadas estirpes, raças ou amostras, do vírus 17D; o cuidadoso registro das subculturas passadas e presentes usadas no preparo da vacina constituíam não uma etapa do processo produtivo, mas um conjunto de operações trabalhosas e, problemáticas. O 17D referido nos textos destinados ao público externo ao laboratório era uma abstração: as subamostras do vírus formavam uma galhada complexa e, nos meios de cultura onde esses ramos se perpetuavam e multiplicavam, os vírus constituíam microcosmos vivos nem sempre estáveis ou previsíveis. Toda vez que aparecia uma discrepância no comportamento esperado, tornava-se necessário remontar aos ascendentes dos espécimes usados na fabricação dos lotes problemáticos, e se enveredava por uma teia cada vez mais densa de pessoas, artefatos, laboratórios, variáveis condições e meios de cultura...

O *Manual da vacina* apresentava a genealogia das diversas subamostras empregadas no preparo de vacinas no Brasil. Essas derivações da cepa original do 17D eram identificadas por símbolos que designavam a origem e a técnica de manutenção do vírus, assim como o número aproximado de subculturas ou passagens que havia sofrido.[3] O quadro que vemos a seguir, e as informações complementares contidas no manual começaram a ser elaborados em janeiro de 1941 e sofreram revisões em 16 de abril e 27 de novembro de 1942. O quadro de derivações de subamostras ficou pronto em 17 de abril de 1943. As revisões refletem as mudanças efetuadas em decorrência da baixa da potência da vacina, do surto de icterícia e das encefalites, que levaram à implantação do sistema de lotes semente.

Derivação de subamostras do vírus 17D usadas no Brasil [4]

Símbolo	Descrição
17D baixa s.c.	Vírus trazido de Nova York em 1937, por H. H. Smith, sob a forma de subcultura 150 da série 17D. No Rio de Janeiro, o cultivo prosseguiu até a subcultura 243. As subculturas 235 a 243, em tecido, foram usadas em vacinas. Duas derivações dessa série, partindo das subculturas 200 e 190, prosseguindo em embrião, foram designadas como 17D2 Rio e 17D3 Rio.
17D2 baixa s.c.	Derivação da 17D baixa s.c. na subcultura 200. Considerada especialmente interessante, porque parecia ser bastante diferente da 17D baixa s.c.
17D3 baixa s.c.	Ramo que se desprendeu na subcultura 190. Só prepararam vacina com as subculturas 196 a 219.
17DD-NY 102	Importação em janeiro de 1940, de Nova York, sob a forma de lote 102. Preparado com a subcultura 212 (em tecido) do 17DD. As culturas em série prosseguiram no Rio de Janeiro até a s.c. 249.
17-NY 104	Importado também em janeiro de 1940, de Nova York, como lote 104, preparado com a subcultura 223 (em tecido) de 17D. No Rio, houve quatro ou cinco passagens adicionais em embriões para produção de vacinas.
17D-NY 310	Importado de Nova York em novembro de 1941, sob a forma de lotes 310, 312 e 318. Derivação em pequeno número de passagens seriadas em embrião de galinha da s.c. 225 do 17D.
17DD baixa s.c.	A subamostra 17DD foi trazida de Nova York, em 1937, pelo dr. H. H. Smith, sob forma de subcultura 229 da série 17DD, e de vacina NY 41, preparada com essa mesma subcultura. No Rio de Janeiro, prosseguiram as culturas em tecido, considerando-se como pertencentes à raça 17DD baixa as culturas compreendidas entre 229 e 255. Foi feita uma ou outra passagem por embriões em desenvolvimento, não mais do que cinco, em série, em 1937 e 1938. Mas a linha principal foi através de culturas de tecido. Com material da mesma origem, (vacina NY 41, diretamente ou depois da passagem por embriões em desenvolvimento), foram iniciadas, a partir de 1940, várias séries de culturas que receberam a identificação de 17DD1 a 17DD8. Toda vez que uma delas atingia a proximidade da subcultura 250, era interrompida, iniciando-se a série seguinte, com material de subcultura aproximadamente 230. Todas essas derivações eram consideradas como sub-raça de 17DD baixa.
17DD alta s.c.	Os vírus das subculturas acima de 300 foram considerados da raça 17DD alta. Alguns lotes de vacina foram preparados a partir de pequenas derivações (uma ou duas passagens) em embriões de galinha.
EP baixa pass.	Vírus trazido de Nova York, sob forma de material seco da subcultura 229 da série 17DD. Foi mantido no laboratório do Rio de Janeiro, *in vitro*, em tecido embrionário desnervado por 14 subculturas, e depois por passagens em embriões de galinha. Vacinas começaram a ser preparadas com material proveniente da 35ª à 40ª passagem em ovo. Essa é a subamostra em uso ainda hoje em Bio-Manguinhos, já que neste intervalo, e com esse material, foi implantado definitivamente o sistema de lotes semente.
EP alta pass.	Material com mais de 76 passagens por embriões de galinha. A série de passagens foi interrompida na subcultura nº 150.



Quadro demonstrativo das derivações das subamostras do vírus 17D em uso no Brasil, diferenciando as passagens feitas em cultura de tecido das realizadas em embrião de galinha. 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/ Bio-Manguinhos/Fiocruz

De acordo com a descrição elaborada por Penna em 1956 (pp. 70-2), há vários anos o Laboratório do Rio de Janeiro vinha usando a subcepa "EP baixa pass" ou "17 dd-low EP", devido à sua alta "imunogenicidade", ao fato de não apresentar propriedades encefalitogênicas e de não estar associada à produção de icterícia.

A adoção desta subamostra está relacionada à implantação do sistema de lotes semente, cuja finalidade, como dissemos, era manter o vírus vacinal o mais uniforme possível, limitando a um mínimo o número de passagens e, com isso, o risco de possíveis mutações. O sistema era constituído de um lote fonte, também chamado *master*, que, após uma passagem em ovos embrionados, dava origem a vários lotes primários, os quais, por mais uma passagem, engendravam muitos mais lotes secundários que serviam como fonte de vírus para a produção da vacina, numa última passagem pelos embriões de galinha. Assim, de 1944 até hoje, vem sendo mantido o mesmo número de passagens. Os lotes semente primário e secundário atualmente em uso correspondem, respectivamente, à 41ª e 42ª passagem em embrião de galinha, e conseqüentemente às 284ª e 285ª subculturas da cepa 17D original. Todos os lotes de vacina antiamarílica produzidos em Bio-Manguinhos correspondem à 43ª passagem em embrião de galinha e à subcultura 286 do vírus 17D original. Ver Sistema de lotes-semente de febre amarela 17DD.

Se os leitores observarem o quadro das derivações das subamostras do vírus 17D usadas no Brasil, observarão que as passagens do vírus foram mantidas, durante certo tempo, dentro daqueles limites fixados em 1939 (entre subcultura 229 e 255), formando a série de oito seguimentos paralelos que o quadro identifica como "17DD low". Dessa faixa despreendeu-se a série de passagens em ovos embrionados (EP) que foi 'imobilizada' pelo sistema de lotes semente nesse novo patamar de subculturas. Até chegar-se à definitiva implantação desse sistema, durante as crises de 1939 a 1942, testaram-se várias outras subamostras trazidas de Nova York. Em janeiro de 1940, vieram os lotes 102 e 104, que foram usados em provas de campo e como 'semente' para preparar vacinas. O quadro de "Derivação de subamostras do 17D usadas no Brasil", na versão consolidada em 17.4.1943, registra como 17D-NY 310 o vírus recebido de Nova York em 21 de novembro de 1941, sob forma de lotes vacina 310, 312 e 318, preparados a partir de material derivado da vacina 88 da Colômbia. Em 1941 e 1942, os técnicos dos laboratórios nova-iorquino e carioca trocaram diversas cartas com o intuito de determinar a origem dos lotes recém-importados.[5] Pedimos licença aos leitores para resgatar detalhes desta história, para que vejam como era complexa a genealogia dos vírus utilizados no Brasil, antes de cristalizar-se o sistema de lotes semente.

O lote 310 — testado, como vimos, em Guaxupé — descendia de uma subamostra do 17D denominada 17D 204. Depois de formada, continuaram a se fazer sucessivos cultivos em tecido; a 221ª passagem foi usada para inocular ovos, e o vírus colhido nestes embriões deu origem ao lote NY 75, e a uma vacina constituída de 20% de suco de embrião de galinha e 80% de soro humano normal, não diluído. Em maio de 1938, o laboratório de Nova York enviou a Bogotá 340 tubos dessa vacina. O vírus passou por mais quatro subculturas. A partir da 225ª (isto é, a 4ª na série Bogotá), foi inoculado num lote de ovos, originando-se o lote Bogotá 70, o qual, por sua vez, serviu de semente para os lotes Bogotá 88 e 90, em cuja produção foram usados 10% de embrião de galinha em suspensão e 90% de soro humano normal inativado, sem filtragem.

Em agosto de 1940, os dois lotes foram enviados a Nova York e, em janeiro de 1941, o Bogotá 88 foi semente para a produção da vacina Nova York lote 147-1, constituída de 20% de embrião de galinha e 80% de soro humano normal inativado. Este lote deu origem a diversos outros, inclusive os de número 310, 312 e 318, enviados ao Rio de Janeiro em 1941 (*Manual da vacina*, p. 4-B-b).

Os lotes de vacina 102 e 104, importados um ano antes, originaram-se de sementes diferentes. O primeiro proviera da subamostra 17DD-212-1E (de *one egg*, um ovo, em inglês). A série 17DD em cultura de tecido foi iniciada em 9 de julho de 1936, usando-se como inóculo a 196ª subcultura da amostra 17D cultivada em tecido e reidratada. As primeiras culturas do

17DD foram denominadas "17DD — 197ª subcultura" e assim sucessivamente. Essa série continuou a ser cultivada em paralelo à série original do 17D. Em 3 de setembro de 1936, a 212ª subcultura do 17DD foi congelada e dessecada. Três anos depois (13.10.1939), parte dela foi reidratada e inoculada em embriões de galinha. O vírus assim obtido chamou-se 17DD-212-1E. Este lote foi dessecado e armazenado até 8 de janeiro de 1940, quando serviu como semente para a inoculação de embriões que deram origem ao lote 102.

A "vacina lote 104" ou 17D-NY 104, testada no 10º Regimento de Infantaria em Belo Horizonte, pertencia à série original de culturas do 17D. Em 18 de setembro de 1936, a 223ª subcultura foi congelada e dessecada. Em 13 de outubro de 1939, parte dela foi reidratada e inoculada em embriões de galinha. O vírus originário dessa passagem recebeu o rótulo 17D-223-1E. Em 22 de janeiro de 1940, serviu de semente para a inoculação de embriões que geraram o lote 104 (p. 4-B-b).

A adoção do sistema de lotes semente simplificou isso tudo, criando um sistema mais estável, mais fácil de controlar, com apenas duas gerações sempre ancoradas numa matriz estável por tão longo tempo que podia ser considerada quase imutável. Adotado universalmente na produção de outras vacinas, o sistema de lotes semente possibilitou muito maior controle das mutações genéticas dos vírus vacinais, da imunidade e das reações que induzem, facilitando a padronização de metodologias de produção e de controle em laboratório e em campo. Mas foi só em 1944 que a subamostra 17DD E.P passou a ser "a única empregada em vacinações", depois de novos estudos de antigenicidade feitos no Espírito Santo e no sul da Bahia, na zona do cacau, às margens da estrada de ferro que dava acesso a Ilhéus ("Relatório de atividades da Seção de Vacina", 1.1- 30.6.1944). No relatório correspondente ao período de janeiro a junho de 1945, consta que estava em curso um programa experimental em tropas do Exército, visando a comparar a antigenicidade da amostra 17D utilizada pelo laboratório de Nova York com a de um lote produzido no Rio de Janeiro pelo sistema de lotes semente.[6] Em junho de 1946, Aguiar e Fonseca da Cunha partiram para Santos com as vacinas do Rio de Janeiro e de Nova York. Recolheram amostras de sangue de trezentas pessoas antes de vacinar duzentas com o imunizante brasileiro e cem com o norte-americano. Um mês depois, voltaram àquela cidade para colher sangue e comparar os anticorpos presentes nas duas amostras ("Resumo de atividades do laboratório" em 1946). Tudo indica que os resultados não foram muito bons, ou foram contraditórios, e em meados de 1947 amostras do soro colhido em Santos foram submetidas a novas provas de proteção no Rio de Janeiro e em Nova York, verificando-se que a imunidade obtida não era satisfatória, "tendo sido, portanto, confirmadas as conclusões a que já se havia chegado de que o vírus 17D modificou-se na sua antigenicidade".[7]

A deficiência se verificara tanto na subamostra local como naquela do laboratório da Fundação Rockefeller. Supondo que isso se devesse às passagens efetuadas durante tantos anos com o objetivo de reproduzir o vírus, os técnicos do Rio de Janeiro decidiram reviver material dessecado e preservado desde 1937. As propriedades imunizantes dessa subamostra do 17D foram testadas em Araraquara, em 150 pessoas, tendo-se colhido amostras de sangue antes e depois da vacinação para compará-las quanto ao teor em anticorpos capazes de neutralizar a ação do vírus não atenuado em camundongos e macacos ("Resumo de atividades do laboratório" em 1947).

Em junho de 1948, o laboratório do Rio de Janeiro recebeu de Nova York duas ampolas de vacina preparadas com vírus neurotrópico francês do dr. Peltier, e outras duas preparadas por Theiler, em Nova York, inoculando o mesmo vírus em embriões de galinha. Com este material, chegou a ser feito um lote de vacina "para emprego eventual no Brasil, caso haja indicação".[8] Não consta que tenha havido.

Preparação do inóculo

Em janeiro de 1942, Henrique Penna escreveu em seu *Diário* (p. 1): "Durante as últimas semanas, tenho dedicado todo o meu tempo a modificações da técnica de preparação da vacina tendentes a aperfeiçoá-la". Coexistiam, então, no

laboratório do Rio de Janeiro técnicas que estavam prestes a ser suprimidas e técnicas novas, que ainda não tinham suplantado completamente as antigas. O sistema de lotes semente ainda não desalojara o sistema de replicação contínua, que acabava de ser responsabilizado pelas encefalites pós-vacinais.

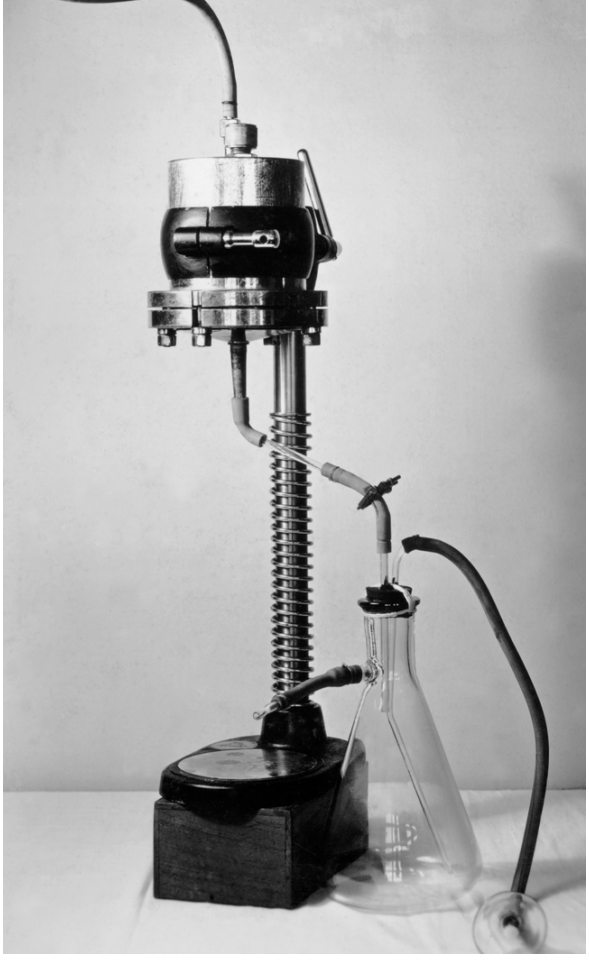
Cultivava-se o vírus em ovos embrionados, mas as passagens em série por culturas em tecido, *in vitro*, ainda constituíam fonte constante de material fresco ou dessecado para inocular em ovos e produzir vacina, requerendo, neste caso, o uso de soro humano (supostamente) normal.

O vírus necessita de células vivas para se multiplicar. Nas culturas *in vitro*, provinham de embriões de galinha. Depois de oito a dez dias de incubação, eram retirados dos ovos e lavados em solução isotônica de cloreto de sódio (NaCl). Eliminava-se o sistema nervoso, removendo-se a cabeça e a espinha dorsal, e cortava-se o resto do embrião em pedaços pequenos.

O vírus provinha de uma subcultura anterior. O material já infectado existente nos frascos onde ela fora feita (frascos de Erlenmeyer de 50 c.c.) era centrifugado para que os fragmentos de tecido fossem ao fundo, e se pudesse aspirar o líquido sobrenadante, repleto de vírus.

Os pedaços de embrião que iam servir à nova cultura eram imersos num líquido formado pela mistura de solução de Tyrode[9] e 10% de soro humano normal, previamente aquecido a 56ºC, por duas horas, e em seguida filtrado através de discos de Seitz, supondo-se que isso "inativasse" qualquer microrganismo contaminante. O soro devia, ainda, ter prova de proteção negativa; não podia conter anticorpos da febre amarela, o que significa que não devia oferecer proteção alguma ao camundongo ou macaco injetado com este soro e, em seguida, com material virulento.

Imediatamente antes de iniciar-se o cultivo *in vitro* do vírus, a mistura de soro-Tyrode era filtrada através de disco de Seitz e distribuída em volumes de 4 c.c., em seis a oito frascos de cultura numerados. Com uma pipeta Pasteur, depositava-se o tecido em cada frasco e se adicionava o inóculo: 1 c.c. do líquido sobrenadante do frasco de número correspondente da subcultura anterior. Os frascos da nova subcultura eram postos na estufa de incubação, a 38ºC. Obtinha-se a maior concentração de vírus 48 horas depois, mas, na prática, as passagens duravam de três a quatro dias.[10]



Filtro Seitz grande para soro ou vacina. Rio de Janeiro, 1941-1943. Manual da Vacina/LAFA/ Bio-Manguinhos/ Fiocruz

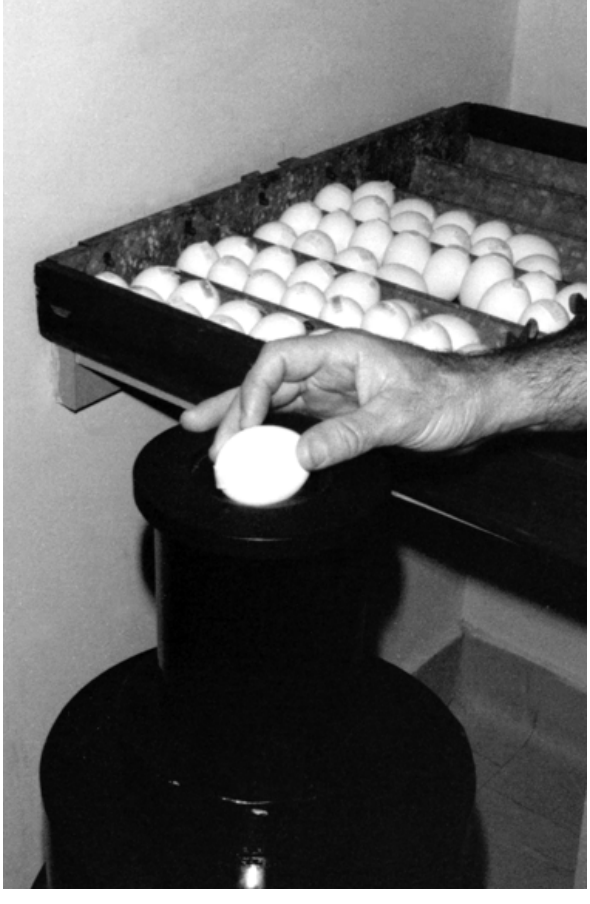
Quando se iniciou a produção de vacinas em grande escala no laboratório do Rio de Janeiro, adotou-se outro método de cultivo do vírus – em ovos embrionados, que descreveremos adiante. Os dois métodos coexistiam em 1942, predominando, no entanto, o segundo, que permitia obter maior quantidade de material virulento e maior concentração de vírus no líquido vacínico. Tinha muitas outras vantagens em relação ao método

anterior, que além de proporcionar menor rendimento, exigia numerosas e complexas manipulações de toda a vidraria mobilizada para o cultivo do vírus, o que favorecia, inclusive, as contaminações

Em abril de 1942, data de revisão da parte do *Manual da vacina* correspondente a esta operação, ainda se usava "com freqüência, embora sem regularidade", vacinas não diluídas, cultivadas por ambos os métodos, como inóculos para a obtenção de novas vacinas. Para evitar que ocorressem outras mutações no vírus em decorrência das passagens seriadas em embrião, tomava-se agora o cuidado de evitar cadeias com mais de cinco passagens.

O sistema de lotes 'semente' já estava sendo implementado. Como dissemos, as múltiplas passagens, nesse caso, ficavam adstritas a apenas três patamares. O chamado "lote primário" era feito com uma vacina que envolvera o uso de soro humano nas subculturas ascendentes, mas que tivera este componente eliminado nas subculturas posteriores à escolha do lote para servir de inóculo em ovos que geravam lotes semente secundários. Estes eram usados exclusivamente como fonte de vírus para os lotes efetivamente destinados à vacinação humana. Muitos lotes secundários — no caso do 17 dd-low EP, correspondentes à 42ª passagem em embrião de galinha e às 285ª subcultura da cepa 17D original — podiam ser preparados a partir do lote primário, correspondente à passagem e subcultura imediatamente anterior. Além de evitar o uso de vírus cultivado em tecido com soro, era possível preparar um número quase ilimitado de lotes de vacina com vírus do mesmo nível de subcultura, reduzindo ao mínimo a possibilidade de que ocorressem mutações. Os lotes semente eram — e são ainda — preparados da mesma maneira que os lotes vacina.[11]

Atualmente, os lotes semente secundários são submetidos aos mesmos testes que se aplicam aos lotes de vacina, e a um controle suplementar: o teste de neurovirulência e viscerotropismo em macacos suscetíveis à febre amarela, de acordo com a norma técnica estabelecida pela Organização Mundial de Saúde em 1998.[12]



Durante os oito ou nove dias que antecedem a inoculação, os ovos são analisados por transiluminação, num procedimento chamado ovoscopia, em três oportunidades: assim que são recebidos no laboratório, no quinto dia e ao final do período de incubação. A finalidade do exame é verificar o estado geral do ovo e do embrião que, se não for satisfatório, resulta em descarte. Os ovos aprovados estão aptos para receber o inóculo. Rio de Janeiro, RJ, década de 1970.
Álbum LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Aquisição e incubação dos ovos

Os ovos utilizados na fabricação da vacina eram fornecidos, semanalmente, por uma granja comum, variando o número de acordo com a fertilidade presumida e a produção programada. Ao chegarem, eram examinados à contraluz — diz-se 'ovoscopia por transiluminação' —, eliminando-se os que já continham embriões formados. Logo se comprariam somente ovos brancos

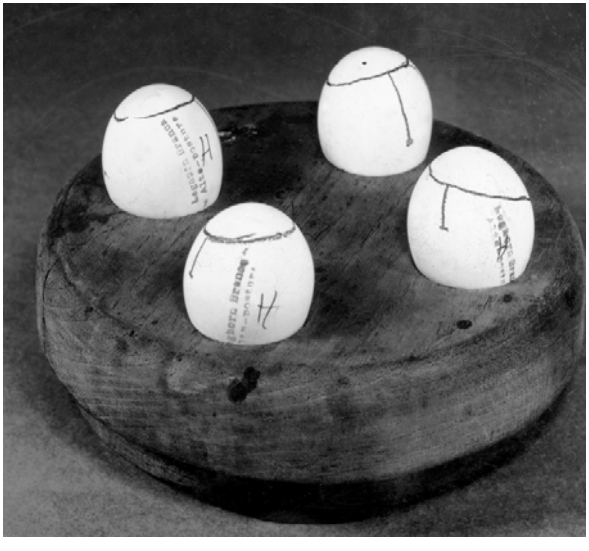
leghorn, mais fáceis de observar, com até uma semana de idade (Penna, 1956, p. 69). Os lotes de ovos eram numerados e armazenados a cerca de 20ºC. No dia seguinte à sua chegada, providenciava-se a incubação. Bandejas com capacidade para sessenta a setenta unidades eram apoiadas em armações de madeira nas paredes do quarto de incubação, com renovação de ar e controle de umidade. Esta era mantida a 50% e, diariamente, se abria a porta do quarto por cerca de uma hora, pois se havia constatado que um curto resfriamento diário dos embriões estimulava seu crescimento.

O tamanho dos lotes incubados dependia da quantidade de vacina que se queria produzir e da fertilidade dos ovos, que era geralmente de 80%, diminuindo no verão para 50%, às vezes menos. Em 1942, para se obter um lote com 900 c.c. de vacina feita com soro humano, inoculavam-se aproximadamente 160 embriões, o que requeria a incubação de duzentos a trezentos ovos. Com o novo tipo de vacina sem a adição de soro, era preciso inocular trezentos embriões de cada vez, o que requeria o dobro de ovos.

Em 1956, já se havia estabelecido que a fertilidade não podia ser inferior a 70%, de maneira a economizar espaço de incubação. Normatizou-se, também, o tamanho dos ovos: não podiam — e essa regra vale ainda hoje — atravessar uma abertura de 4 cm de diâmetro, pois ovos menores não se sustentariam nos anéis de borracha do aparelho Penna-Picckels, que passara a ser usado para a remoção dos embriões. O laboratório consumia, então, dois mil ovos por semana (Penna, 1956, p. 69). Atualmente, são oito mil, com menos de cinco dias de postura, limpos já na granja, acondicionados em caixa de papelão com baixa concentração de formol. Desde 1982, Bio-Manguinhos utiliza somente os chamados ovos SPF — *Specific Pathogenic Free*, ou livres de agentes infecciosos específicos. Quinze vezes mais caros, mas permitindo o controle de quinze vírus aviários que contaminam ovos normais, são produzidos por uma única granja, que detém total controle do mercado.

A incubação a 37,8ºC durava oito a nove dias. No quinto dia, submetiam-se os ovos à transiluminação e se retiravam os "brancos" (estéreis) e os que continham embriões mortos. Em 1942 e ainda em 1956, era preciso girar os ovos todos os dias, manualmente, durante o período de incubação. No oitavo ou nono dia, eram de novo examinados à contraluz. Mais embriões mortos eram descartados, marcando-se com lápis, na casca dos ovos aproveitados, a posição do embrião vivo e da câmara de ar que o envolvia. Os ovos eram mantidos com a face marcada para cima até a manhã seguinte, quando eram novamente examinados para se eliminar, ainda uma vez, quaisquer embriões mortos.

Hoje, realizam-se duas incubações semanais, de nove dias, em aparelhos muito mais sofisticados que garantem temperatura de 37,8ºC, umidade interna de 55% a 60% e viragem automática dos ovos. Antes de cada operação, é feita a descontaminação das incubadoras por fumigação com solução de formol e permanganato de potássio.



Suporte rotativo com ovos prontos para serem inoculados com o vírus vacínico. Antes, esses ovos passaram por nova ovoscopia, que permitiu marcar com lápis, sobre a casca, a posição da câmara de ar e do embrião. A marca deve ser mantida para cima, quando da inoculação. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Inoculação dos embriões no ambiente à prova de poeira. Perfura-se a casca com estilete, através de uma gota de tintura de iodo posta sobre a câmara de ar, e injeta-se, próximo ao embrião, 0,06 cc do material que serve de fonte de vírus. Após o procedimento, faz-se a selagem do orifício. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943. Manual da Vacina/ LAFA/ Bio-Manguinhos/ Fiocruz

Inoculação dos ovos

Começava a segunda etapa do processo, a inoculação dos ovos, no ambiente mais protegido do laboratório, o "quarto à prova de poeiras". Os ovos eram colocados em suportes rotativos com capacidade para quatro unidades em pé, com a extremidade mais larga — aquela marcada a lápis — para cima. Pingava-se aí uma gota de tintura de iodo, para esterilizar o local onde a casca era perfurada por meio de um estilete. Feito isso, era introduzida no mesmo orifício uma agulha que se aproximava do embrião, após ter perfurado a membrana interna da câmara de ar, injetando-se 0,06 c.c. de um dos inóculos descritos acima.

O *Diário* de Henrique Pena nos revela os esforços que fazia em 1941-42 para aperfeiçoar este método, que tinha inconvenientes: morriam muitos embriões atingidos pelo iodo ou contaminados por bactérias, o que Penna atribuía à inadequada desinfecção dos ovos e ao pó contaminado da casca que penetrava durante a perfuração.

Ele buscava uma maneira de fazer a inoculação que dispensasse o uso do desinfetante, assegurando, porém, a assepsia da casca antes da introdução da agulha. Fez diversas experiências com um maçarico antes de chegar ao procedimento padrão. Primeiro, usou a chama para perfurar a casca, sobre a câmara de ar, efetuando a injeção através desse orifício, mas com freqüência o aquecimento do ar contido na câmara que envolvia o embrião fazia a casca estalar. Tentou, então, diminuir a pressão interna fazendo antes um furo no lado oposto àquele onde aplicava a chama do maçarico e, em seguida, a agulha de inoculação. Verificou que o pó de casca resultante do primeiro furo penetrava na câmara de ar pelo orifício da agulha, contaminando o embrião. Penna tentou, ainda, afinar a casca

em determinado ponto, com esmeril de dentista, até que a membrana ficasse quase exposta. A chama do maçarico podia ser aplicada mais rapidamente, para eliminar essa frágil barreira, evitando, assim, que o calor danificasse o ovo.[13]

A técnica vigente a partir de 31 de março de 1942 consistia no uso da chama do maçarico de oxi-acetileno para perfurar a casca (*Manual da vacina,* p. 10). O segmento queimado esboroava-se com facilidade, permitindo a penetração da agulha de inoculação de 1/4 de cc, acoplada à seringa originalmente desenhada para aplicar tuberculina. O orifício era fechado com uma mistura de parafina e breu.

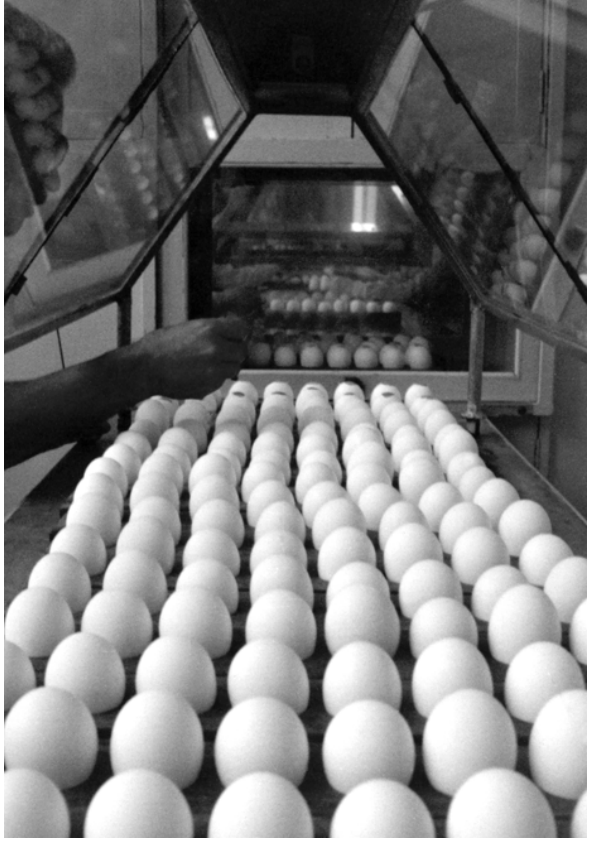
O relato de 1956 (Penna, pp. 69-70) revela outras mudanças relacionadas à preocupação com a assepsia e a produtividade. Cada sublote com cerca de cem embriões era processado independentemente, até que os testes bacteriológicos comprovassem sua esterilidade. Os ovos eram arrumados em suportes de madeira, agora com capacidade para sustentar oito unidades, na mesma posição. Uma pequena área da casca era pintada com tintura de mertiolato, e os suportes eram impelidos através de uma porta dupla que se abria na altura de uma mesa comprida, na sala à prova de poeiras, onde seis pessoas executavam as operações manuais em fluxo contínuo. Uma queimava com o maçarico a oxigênio uma área de alguns milímetros na parte da casca do ovo pintada com mertiolato. Outro perfurava a casca com um instrumento pontiagudo que, de oito em oito ovos, era mergulhado num recipiente com álcool e flambado. O terceiro operador introduzia a agulha de inoculação, montada numa seringa de aplicar tuberculina, e injetava na cavidade amniótica, nas proximidades do embrião, os mesmos 0,06 c.c. de inóculo. A cada oito ovos, a seringa era substituída. Dois operadores selavam os ovos com cera quente, e o sexto preenchia as seringas.

Hoje, as operações são as mesmas, com idêntica feição manufatureira, ainda que transcorram em ambiente provido de dispositivos tecnologicamente mais sofisticados e sujeito a regras de conduta e indumentária muito mais rigorosas, visando a obter o máximo de assepsia.

Inoculação de ovos na sala à prova de poeira, verificando-se algumas inovações, como o fluxo contínuo dos ovos, que são manipulados por diferentes operadores.
Rio de Janeiro, RJ, 1956.
Penna, 1956, p. 70

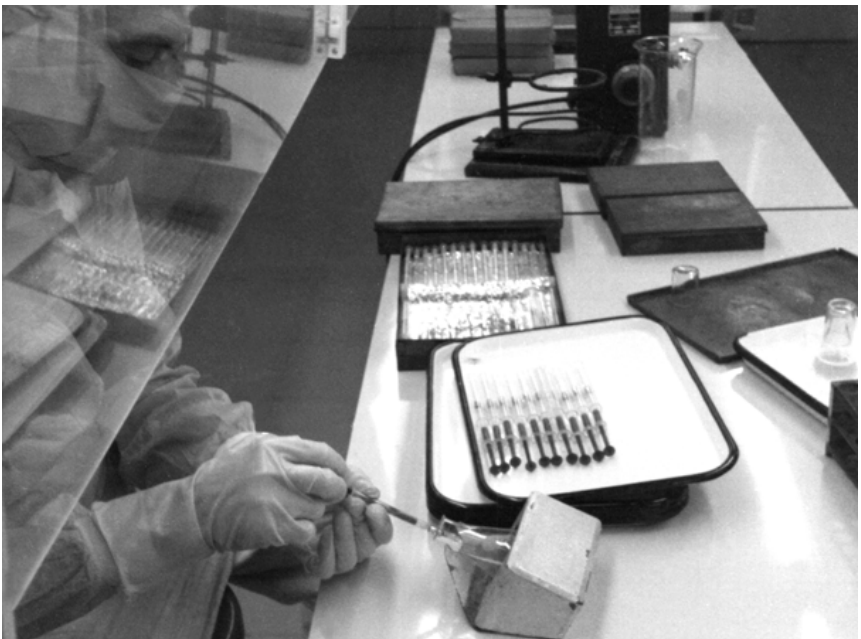
Os suportes com os ovos desinfetados com tintura de iodo são transferidos para a chamada "área biolimpa" através de um *pass through*, que funciona de modo parecido com a porta dupla mencionada acima, barrando, porém, mais eficazmente os contaminantes do ambiente externo, graças sobretudo à pressão negativa mantida na sala onde se efetua a inoculação. O estilete usado para perfurar a casca é limpo a cada dez ovos, em solução de álcool iodado. A seringa tuberculínica, substituída a cada 16 ovos, introduz diretamente na cavidade vitelina mais ou menos 1000 PFU de suspensão viral, preparada a partir do lote semente secundário diluído em solução salina a 0,85% (PFU ou Plaque Forming Units é o método de titulação em cultura de células que substituiu, nos anos 1980, o antigo método de doses letais em camundongos, como mostramos no final do capítulo quatro). O material usado para selar o orifício é cola plástica misturada com gotas de fenol.

Da suspensão de inóculo é retirada amostra para teste de esterilidade bacteriana e fúngica. Em 1941-42, quando os níveis



Os ovos a inocular são dispostos em blocos de madeira, contendo cada qual oito unidades, na posição vertical, com a parte mais larga para cima. Uma pequena área da casca, no topo do ovo, é marcada com tintura de mertiolate e os blocos de madeira são conduzidos através da porta dupla para a sala à prova de poeira, onde se processa a inoculação.
Rio de Janeiro, RJ, década de 1970.
LAFA/
Bio-Manguinhos/
Fiocruz

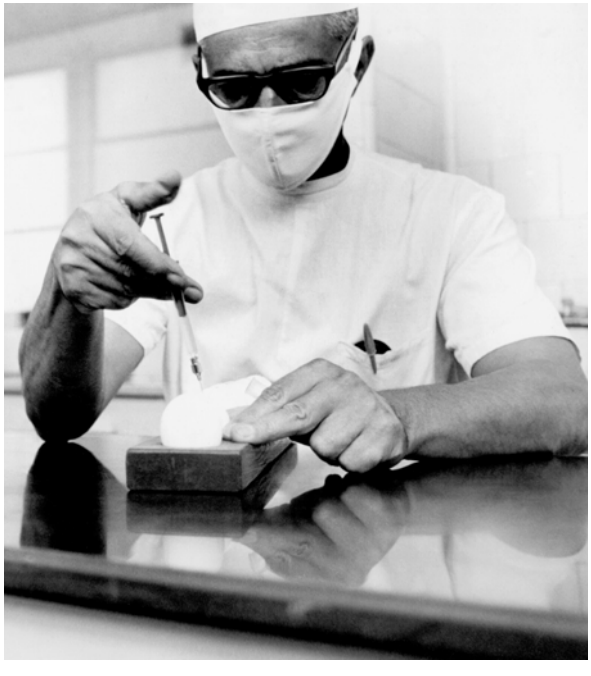
Preparação dos ovos para inoculação. A chama do maçarico fragiliza a casca no ponto onde penetrará a agulha de inoculação.
Rio de Janeiro, década de 1960.
Álbum LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz



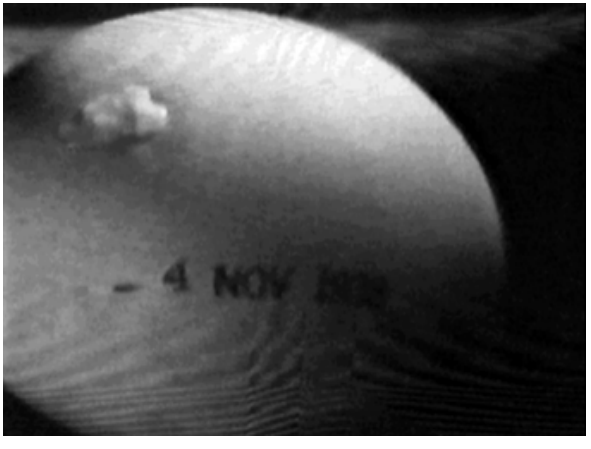
Preparação das seringas que são preenchidas com o vírus vacinal a ser inoculado nos ovos.
Rio de Janeiro, RJ, década de 1970.
LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

de contaminação eram muito mais altos, o operador depositava 1c.c. do material utilizado como fonte de vírus num balão contendo caldo glicosado, antes de encher a primeira seringa para inocular os ovos, e repetia a operação com o material restante, depois de encher a última seringa.

Os ovos inoculados eram levados de volta à câmara ou quarto de incubação e lá permaneciam por mais três ou quatro dias, à mesma temperatura (37,8ºC). Existia uma relação entre a concentração (título) de vírus no inóculo e o dia em que ela atingia o máximo nos embriões. A relação variava conforme a amostra de 17D utilizada e, por isso, só era possível determiná-la empiricamente, de acordo com o lote que fornecia o inóculo (*Manual da vacina*, pp.10-11). Após a adoção da cepa EP, a técnica padrão incorporou uma regra mais precisa: "Não menos que 5.000 LD_{50} devem ser injetados em cada ovo, se o período de incubação pós-inoculação for de três dias. Em alguns laboratórios, admitem-se quatro dias ... Neste caso, a concentração de vírus no inóculo deve ser menor, para evitar excessiva mortalidade, e o período de incubação pré-inoculação não deve exceder oito dias, de modo a manter a idade dos embriões, à época da colheita, abaixo de 12 dias" (Penna, 1956, p.72).



LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz



À esquerda, inoculação direta na cavidade amniótica, na direção do embrião, mas sem tocá-lo. Morriam cerca de 25% dos embriões por traumatismo causado pela agulha de inoculação. Em 1961, Alberto Romeu Nicolau adotou nova técnica e passou a inocular o vírus na cavidade vitelina, com agulha de menor tamanho. A mortalidade caiu para 5 a 10%, e se obteve título viral mais uniforme na polpa embriônica. Os ovos eram carimbados com a data do início da incubação, e formavam sublotes, que tinham o número do lote seguido de uma letra. Na imagem acima, vê-se um ovo com carimbo da data da sua incubação, 04 de novembro de 1939. A cola selando o orifício resultante da perfuração da agulha mostra que se trata de ovo já inoculado, em fase de incubação, visando obter a maturidade do embrião e o momento adequado para se proceder à sua coleta, com maior concentração de vírus para a confecção da vacina.
Rio de Janeiro, RJ, 1939.
Filme Preparação da vacina de febre amarela/Cinemateca Brasileira

Coleta dos embriões

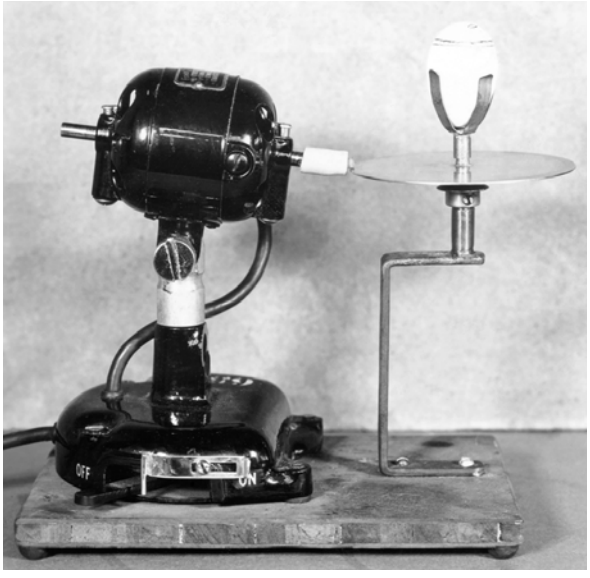
Terminado o segundo período de incubação, destruíam-se os ovos com embriões mortos e transportavam-se os outros para o quarto à prova de poeiras, para serem abertos. Pelo processo primitivo, associado à produção da vacina com soro humano e filtragem, as cascas eram abertas com tesoura, perto da margem da bolsa de ar, depois de lavadas com iodo e álcool. Os embriões eram retirados com pinça, colocados em placas de Petri para serem pesados e, em seguida, triturados.

O soro humano era necessário para a filtragem do vírus, feita através de disco de Seitz. Quando se decidiu suprimir o soro, o primeiro problema que se apresentou foi a eliminação do processo de filtragem e, por conseqüência, o desenvolvimento de um método de colheita mais asséptica dos embriões inoculados com o vírus.

Na verdade, a filtragem tinha, por si mesma, alguns inconvenientes. Além de reter contaminantes e partículas indesejáveis, retinha quantidades variáveis de vírus e entupia quando a proporção de tecido de embrião dissolvido em soro ultrapassava 15% da solução.

Em trabalho publicado em agosto de 1939 (pp. 589-92), Henrique Penna descrevia a técnica e o aparelho que desenvolvera para diminuir a contaminação dos embriões na hora de retirá-los de dentro do ovo. A casca passou a ser cortada com a chama do maçarico oxi-acetilênico, em dois tempos: aplicava-se inicialmente a chama na parte superior do ovo, bem no centro da bolsa de ar, para abrir um furo que desse vazão ao ar aquecido durante a aplicação subseqüente da chama ao redor do ovo, logo abaixo da margem da bolsa de ar, enquanto girava o suporte adaptado a um motor elétrico, na vertical. Removia-se, então, a calota que cobria o pólo do ovo e se extraía o embrião com um gancho de arame especial.

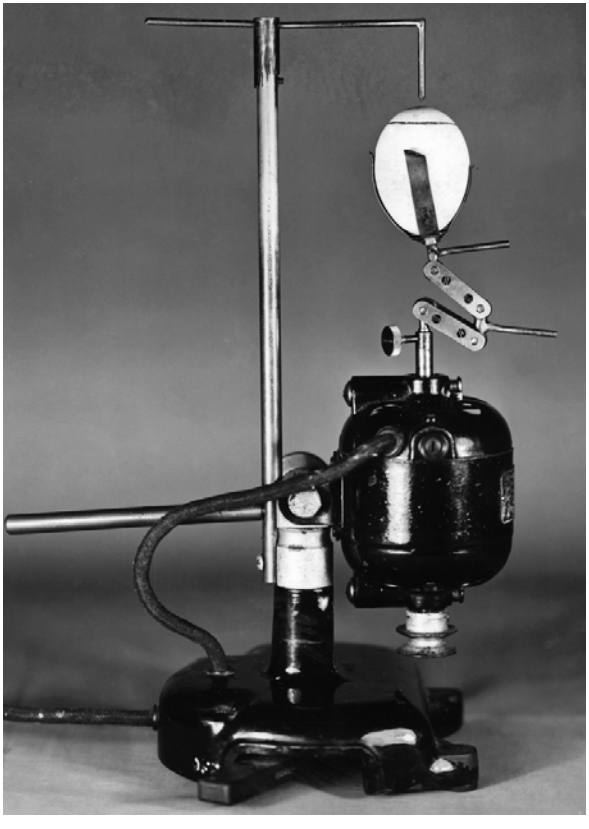
Em 27 de janeiro de 1942, foi utilizada uma versão modificada do aparelho, que imprimia rotação mais lenta e uniforme ao ovo, permitindo que se aplicasse tangencialmente a chama do maçarico para queimar a circunferência da bolsa de ar.



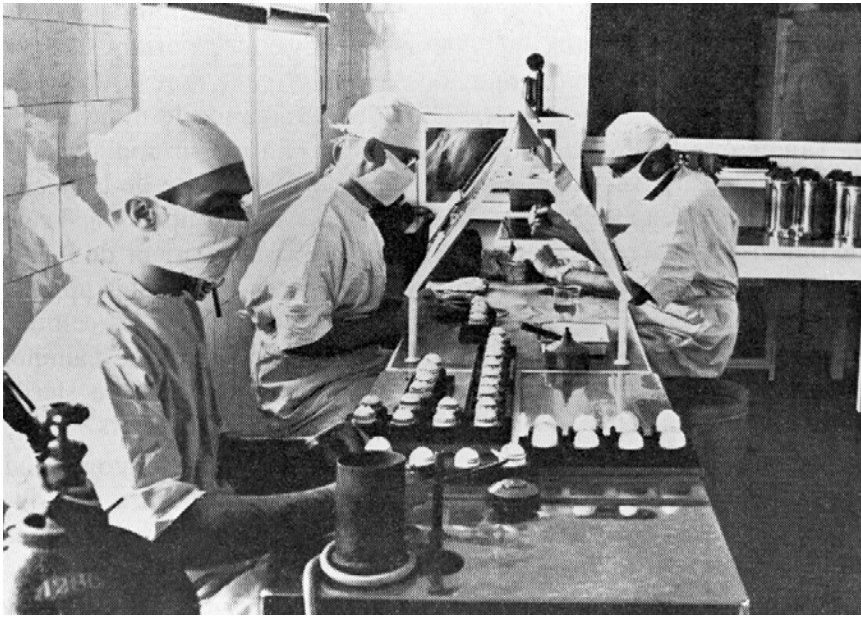
Ovo no suporte, pronto para ser aberto com a chama do maçarico. O aparelho usado desde 9 de janeiro de 1942 é uma modificação do original descrito em American Journal of Tropical Medicine (1939). Consta de um suporte para o ovo, montado sobre um eixo vertical, capaz de entrar em rotação lenta por meio de motor elétrico a ele ligado por transmissão de atrito. A velocidade de rotação é de 60 rpm. A casca de ovo é cortada abaixo da inserção da câmara de ar. Modelo utilizado no laboratório até o final da II Guerra Mundial. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

A descrição de 1956 nos mostra uma linha de montagem um pouco mais sofisticada. Depois que se fazia a triagem dos embriões mortos, os ovos eram colocados num *freezer* a -20ºC, e lá permaneciam por meia hora, no mínimo (Penna, 1956, p. 73). Em seguida, eram colocados em bandejas metálicas providas, agora, de quatro anéis de borracha móveis, acionados por um mecanismo de rotação.[14] À medida que giravam os anéis com os ovos, um de cada vez, o operador aplicava a chama do maçarico tangencialmente, queimando um círculo na margem da bolsa de ar, sem aquecer demais o

interior do ovo. Outro operador levantava os tampos das cascas e expunha os embriões com uma espátula esterilizada por flambagem. O operador seguinte removia os embriões com fórceps também esterilizados e os despejava dentro dos recipientes metálicos dos trituradores chamados *warring blendors* (ibidem).



Ovo no suporte (modelo em uso até abril de 1942) pronto para ser aberto com a chama do maçarico. 1940.
The Organization and Detailed Procedures of the Vaccine Division of the Yellow Fever Laboratory/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz



Coleta de embriões na sala à prova de poeira. Com um maçarico, o operador, no primeiro plano, queima um círculo ao redor de cada ovo, na máquina Pickels, que substitui os aparelhos mostrados nas imagens anteriores. O próximo operador abre a calota do ovo com espátula esterilizada e expõe o embrião. O terceiro coleta os embriões com fórceps esterilizados e os deposita num contêiner de metal que será acoplado à máquina trituradora. A abertura dos ovos é a parte do processo que oferece maiores oportunidades para a contaminação por bactérias; por isso, além de trancorrer numa sala especial, uma coifa de vidro recobre a mesa com a função de proteger as matérias orgânicas manipuladas das partículas em suspensão no ar.
Rio de Janeiro, RJ, 1956.
Penna, 1956, p. 73

Atualmente, desde que os ovos ingressam na área biolimpa através do *pass through*, a coleta dos embriões se processa de maneira quase idêntica. A operação é realizada sob exaustão do ar, para que sejam retirados os resíduos resultantes da queima das cascas e quaisquer outras partículas contaminantes, e a pinça esterilizada que se usa para retirar os embriões é substituída a cada quatro ovos.

Corte da calota para retirada do embrião com maçarico oxi-acetilênico. Rio de Janeiro, RJ, década de 1970.
Álbum LAFA/ Bio-Manguinhos/ Fiocruz

Ovo com calota pronta para ser removida após a aplicação da chama cortante. Suporte usado em combinação com os aparelhos rotativos mais primitivos mostrados atrás. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/ LAFA/ Bio-Manguinhos/ Fiocruz

A coleta dos embriões era, no passado, a parte do processo mais vulnerável à contaminação por bactérias. O uso da chama do maçarico e o quarto à prova de poeiras faziam parte do elenco de medidas destinadas a neutralizar este risco. Os operadores usavam máscaras e aventais esterilizados, lavavam as mãos com água, sabão e ainda álcool.

A princípio, os embriões eram colocados dentro de balões com caldo; passado um tempo, o caldo era retirado e incubado. Esse procedimento favorecia a contaminação, pois a cada embrião colocado, a tampa do recipiente tinha de ser removida e recolocada. Depois, os embriões bloqueavam a passagem do caldo na hora em que se fazia a retirada com a ajuda de uma pipeta. Para evitar a possibilidade de se perder todo um lote de vacina, devido à permanência de embriões contaminados, Penna separou-os em grupos de 15 e os colocou em frascos Kitasato, com tubo soldado para baixo. Os frascos eram agitados, escoando-se o caldo para dentro do balão onde ia ser incubado.

Mesmo assim, os embriões colhidos no laboratório do Rio de Janeiro mantiveram índices de contaminação muito superiores aos de Nova York. Lá, os sublotes eram de cem embriões e, segundo o *Annual Report* de 1940, praticamente não havia contaminação. No Rio, quase sempre se tinha um a dois frascos contaminados em cada cem embriões colhidos. Penna chegou a testar sublotes de cem, mas voltou atrás. Em 1956, a colheita se fazia não apenas numa sala à prova de poeiras, mas debaixo de uma coifa de vidro provida de lâmpada de esterilização ultravioleta (Penna, 1956, p.74). Os embriões mortos eram descartados e os restantes eram separados em grupos de 10 ou 15, em frascos de Erlenmeyer, com 500 c.c. de caldo glicosado. Agitava-se o frasco, transferia-se o caldo para um balão estéril, marcado com o número correspondente ao grupo. Os balões eram incubados a 37°C e examinados no dia seguinte. Se houvesse crescido alguma bactéria, aquele grupo era destruído.[15] Os embriões não contaminados eram reunidos e triturados. Tais precauções causavam uma redução de mais de 50% no título de vírus da vacina. E, às vezes, germes de crescimento lento só se tornavam aparentes nos meios de cultura depois de 48 horas de incubação. Quando isso acontecia, a perda do lote era total.

Vê-se aqui, à esquerda, o aparelho desenvolvido por Penna, em 1939, num período em que a produção não tinha ainda o ritmo da linha de montagem. À direita, operador remove embriões para o frasco onde serão triturados. Os operadores usam máscaras e aventais esterilizados, e, antes da operação, escovam as mãos com água e sabão e as lavam com álcool, seguindo os padrões assepsia da época.
Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/ LAFA/ Bio-Manguinhos/ Fiocruz

Os relatórios do Laboratório de Febre Amarela indicam que até recentemente as contaminações da vacina em diversas fases de sua preparação foram um problema constante, de difícil solução, sobre o qual estiveram permanentemente debruçados Henrique Penna e outros membros de sua equipe. Em 1939, ao descrever a nova técnica para a remoção "asséptica" dos embriões, Penna explicou que a concebera com o intuito de eliminar a infiltração de microrganismos residentes na casca do ovo. "Repetidos testes mostram que o embrião de galinha raramente é contaminado enquanto está no interior do ovo. Por outro lado, métodos de cultivo indicam que uma elevada percentagem de cascas ... contêm bactérias vivas, mesmo depois de terem sido pintadas com tintura de iodo e lavadas com álcool. Isso sugere que grande parte da contaminação de vacinas não filtradas se deve à presença de microrganismos na casca".

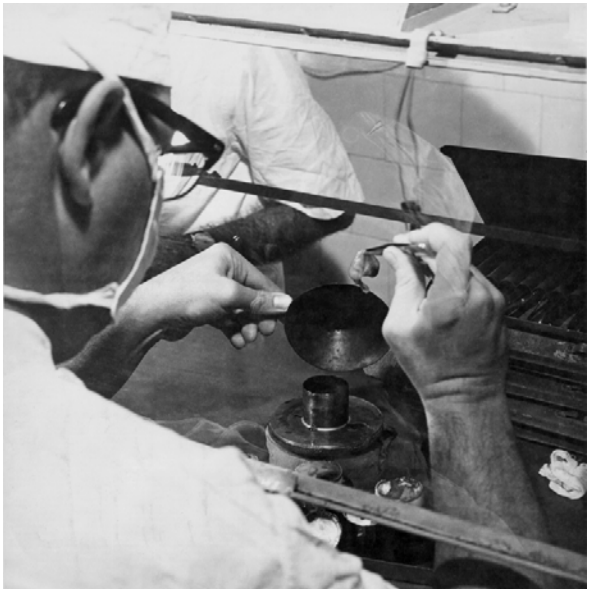
Contudo, as modificações feitas entre 1939 e 1942 nas etapas de inoculação dos ovos e de colheita dos embriões já virulentos não resolveram o problema. Continuaram a ser encontrados, com muita freqüência, tanto nos embriões como na polpa resultante de sua trituração microrganismos diversos mas, principalmente, "germes gram-negativos de forma bacilar (bastonetes), às vezes móveis, que não fermentam os açúcares mais usuais," e que os bacteriologistas do Instituto Oswaldo Cruz classificaram como *Alcaligenes faecalis* em 1943. Ocorria com tanta freqüência nos meses quentes e chuvosos do verão que o laboratório era obrigado a interromper a produção nesse período.

Para retirar-se os embriões inoculados, queima-se um anel perto do pólo maior do ovo com a chama muito quente de um maçarico oxi-acetilênico. A chama não só corta a casca, como também a esteriliza. Um dispositivo movido por motor elétrico, chamado de máquina Pickles, com velocidade graduável, faz girar suportes de borracha em que são colocados os ovos a serem abertos. O primeiro aparelho foi desenvolvido por Henrique Penna, no Rio de Janeiro, e os demais, aperfeiçoados por E. G. Pickels. O modelo ao lado, para abertura de maior número de ovos, foi introduzida no laboratório logo após a II Guerra Mundial. Rio de Janeiro, RJ, 1946.
Manual de Instruções Técnicas e Administrativas do Serviço Nacional de Febre Amarela/ LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

As modificações feitas com o intuito de neutralizar a contaminação danificavam também o vírus, diminuindo a eficácia da vacina. Em 1943, Penna alterou o procedimento adotado na passagem do vírus pelos embriões: "Estou preparando vacina com embriões guardados 24 horas à temperatura de 3ºC a 5ºC, tempo esse suficiente para que as provas culturais preliminares acusem contaminação por *A. faecalis*. Somente os sublotes ... satisfatórios entram na preparação ... da vacina. Brevemente saberei quanto se perde em concentração de vírus por esse proceder" ("Resumo de atividades da Seção de Vacina" 1.1 - 31.12.43). Em março de 1944, já sabia que vacinas preparadas dessa forma apresentavam título mais baixo, tendo, portanto, validade por tempo menor do que as vacinas chamadas "diretas", feitas sem prévia conservação dos embriões. Em compensação, as perdas por contaminação bacteriana, que, no primeiro caso, eram reduzidas "praticamente a zero", nas vacinas diretas, usando-se lotes de aproximadamente trezentos embriões, era considerável: ultrapassavam 50% ("Report of the Vaccine Section", 1943).

A flora bacteriana existente na atmosfera da sala onde se preparava a vacina foi estudada, verificando-se que não coincidia com os contaminantes habituais encontrados nela, os tais "bastonetes gram-negativos". Em maio de 1944, Penna já não sabia ao certo se os ovos chegavam contaminados ao laboratório, e se a contaminação provinha da casca ou do interior do ovo. Não se podia adicionar à vacina nenhum "desinfetante ou preservativo" para não prejudicar o vírus vivo. A instalação da coifa com irradiação ultravioleta no local onde trabalhavam os operadores não deu cabo do problema. Em março de 1947, Penna registrava desalentado: "a porcentagem de contaminações bacterianas ... apesar das diversas medidas postas em prática, aumentou consideravelmente durante os últimos tempos, o que resultou na impossibilidade de serem feitas vacinas durante o mês" ("Resumo de atividades do laboratório" em 1947).

Para esclarecer a origem dos germes "provisoriamente classificados como *Alcaligenes faecalis*, decidiu estabelecer uma pequena colônia de galinhas *leghorn* nos terrenos do laboratório. Em dezembro de 1947, ainda não tinham encontrado nos ovos da granja experimental o microrganismo, nem mesmo quando o inoculavam artificialmente nas galinhas. O problema persistiu, apesar da chegada naquele mês de novo equipamento para abertura asséptica de ovos, em grande escala, importado de Nova York (ibidem).



Rebate das calotas para retirada dos embriões. A parte da casca que cobre a câmara de ar é retirada; a membrana, removida e o embrião, retirado com fórceps esterilizado.
O trabalho contínuo sob luz ultravioleta causava queimaduras e dermatites nos operadores.
Rio de Janeiro, RJ, década de 1960.
LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

A técnica padrão descrita em 1956 incluía a lavagem dos ovos com solução de hipoclorito de cálcio a 1% e uma escova suave de mão. (Penna, 1956, p. 69). Depois passou-se a usar solução a 2% de ácido clorídrico. Nos anos 1960, Alberto Romeu Nicolau, o sucessor de Penna na chefia do laboratório, determinou a supressão desta prática, pois ela destruía o verniz que protegia o ovo, aumentando as chances de contaminação externa. Em 1959, se tinha verificado que o contaminante mais pertinaz da vacina provinha de dentro do ovo. A única maneira de minimizar o problema era efetuar provas bacteriológicas em pequenos grupos de embriões, separadamente. Isso permitia obter "melhores resultados quanto ao número de embriões estéreis, sem, contudo, nos permitir uma produção normal da vacina" ("Resumo das atividades da Divisão de Vírus", 1959).

Coleta dos embriões. Rio de Janeiro, RJ, década de 1960.
LAFA/Bio-Manguinhos/ Fiocruz

O problema só foi resolvido em 1982, quando a oferta de ovos SPF tornou possível seu uso exclusivo, fazendo-se desnecessárias muitas das precauções relacionadas acima.

Preparação do suco de embrião

Hoje, os embriões retirados dos ovos são depositados em copos de trituração de aço inoxidável — 44 por copo — aos quais se adicionam 50 ml de água destilada estéril, antes de tritura os embriões a 12.000 rotações por minuto (rpm), durante cinco minutos, com interrupção de um minuto, durante a qual os copos são colocados em banho de gelo para neutralizar o aquecimento do material, que pode ser prejudicial ao vírus. A cada seis meses, é feito um teste de potência no lote semente secundário usado para inocular os ovos que darão lotes de vacina.

O *Manual da vacina* (p. 23-b) registrava duas revisões na parte concernente à preparação do suco de embrião: em 14 de agosto de 1941 e em 24 de agosto de 1942.

Na preparação da vacina com soro humano e filtragem, os embriões retirados dos ovos eram triturados durante uma hora em moinho de bolas ou em grandes grais com alundum.[16] À pasta resultante adicionava-se o soro humano normal, em proporção tal que o tecido embrionário não excedesse 10% da suspensão, já que concentrações mais altas dificultavam a filtragem do material. A suspensão era transferida para tubos de 250 c.c. e centrifugada por uma hora, a 2.000 rpm. O líquido sobrenadante era filtrado através de grandes discos de Seitz, sob pressão de dez libras, constituindo o filtrado a vacina, pronta para ser envasada e dessecada.

Esse método tinha sérias desvantagens. A concentração de embriões esbarrava no limite de 10%; e mesmo com a adição do soro, perdia-se grande parte do vírus durante a filtragem. Muitos lotes acabavam sendo descartados por causa de titulação insuficiente (Penna, 1956, p. 15).

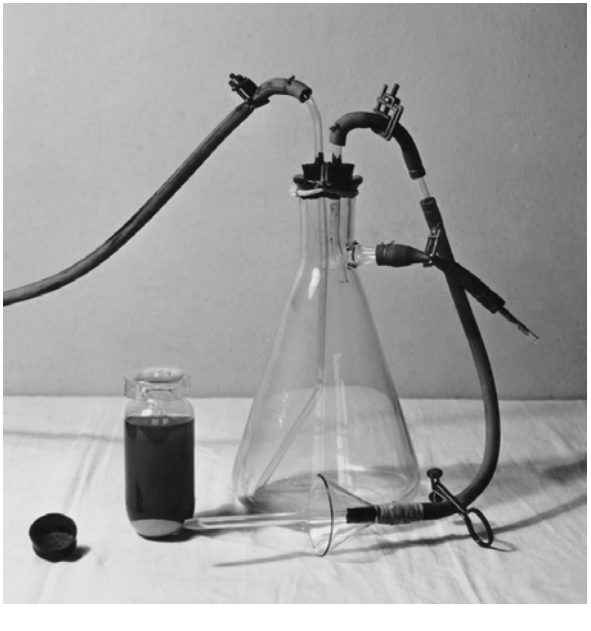
Uma primeira inovação consistiu na vacina ainda com soro, mas sem filtragem. Depois de triturados os embriões,

adicionava-se o soro humano normal de maneira a formar uma suspensão com 20% de tecido embrionário. O soro podia ser diluído a 1:2 em solução salina fisiológica. Após a centrifugação, o líquido sobrenadante era aspirado para um frasco Kitasato: a vacina estava pronta para ser envasada.

As primeiras tentativas de eliminar o soro consistiram no uso de goma arábica a 2% ou, simplesmente, água destilada para produzir o meio em que era suspenso o tecido embrionário. Em 23 de abril de 1942, passou-se a usar suco embrionário não diluído. Assim, na preparação da vacina sem soro e sem filtragem, a trituração dos embriões, a transferência da polpa resultante para os tubos de centrifugação eram feitas da mesma maneira sem, no entanto, adicionar-se o soro ou qualquer outro líquido. Centrifugava-se do mesmo modo o material, aspirando-se em seguida o líquido sobrenadante — a vacina — para o frasco Kitasato (em geral, correspondia a um terço do volume original de polpa).

Vista do laboratório principal localizado no Pavilhão Rockefeller, em Manguinhos, num momento de pausa dos trabalhos. Note-se no chão, à esquerda, o moinho de bolas usado para a trituração dos embriões e, acima dele, três filtros Seitz, utilizados na filtragem de soros ou da vacina. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Moinho de bolas com o frasco onde eram triturados os embriões, modelo adotado até 1941. O procedimento incluía a adição de soro humano para obter-se à suspensão viral. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz



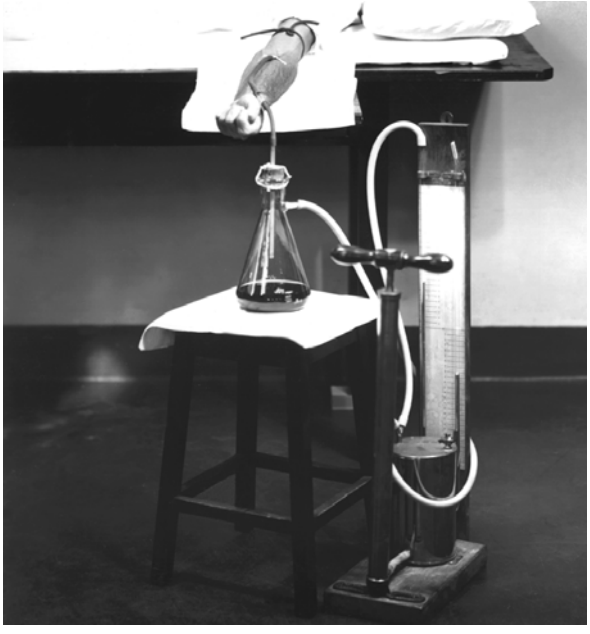
Frasco Kitasato usado para aspirar o sobrenadante (a vacina) de dentro dos tubos de centrifugação. Produzia-se o vácuo no frasco, pouco antes de ser utilizado. A velocidade de aspiração era controlada por uma pinça ajustável, aplicada no tubo de borracha de entrada. A distribuição da vacina era feita diretamente desse frasco para os tubos com 200 doses. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/ LAFA/ Bio-Manguinhos/ Fiocruz

Como dissemos, o soro humano foi suprimido da formulação da vacina, em virtude da contaminação de muitos lotes com um vírus patogênico ainda desconhecido, e que só mais tarde seria reconhecido como o agente da hepatite B. Em 1939, quando irrompeu a epidemia de icterícia no Espírito Santo, as vacinações foram interrompidas e o Laboratório de Febre Amarela do Rio de Janeiro iniciou estudos visando a alterar a composição da vacina.

Curiosamente, no *Manual da vacina* de 1941-42 (p. 23), a eliminação do soro é atribuída principalmente a razões econômicas. Propiciava considerável redução do custo de produção por eliminar as despesas com a obtenção e controle do soro e, também, por permitir maior diluição do extrato de embrião. As vacinas com soro não podiam ser diluídas em proporção superior a 1:20. As sem soro, por causa de seu alto título, admitiam maior diluição e, conseqüentemente, poderiam ser distribuídas em volumes menores nos tubos ou ampolas, o que reduziria ainda mais o preço por dose. Como vimos, a diluição não pôde ultrapassar 1:100, pois se verificou que a concentração de suco de embrião inferior a 1% acelerava demais a deterioração do vírus em campo.

O soro humano logo seria completamente eliminado da preparação da vacina, mas em 22 de abril de 1942 — data de revisão deste item específico do manual — o laboratório do Rio de Janeiro continuava a consumir quantidades relativamente grandes desse líquido orgânico na produção dos dois tipos de vacina mencionadas atrás — como diluente da polpa de embrião e protetor do vírus durante a filtragem, e como componente do líquido sobrenadante nas culturas em tecido, *in vitro*. As precauções na coleta do soro haviam sido redobradas, supondo-se que isso bastasse para evitar a transmissão da icterícia.

O laboratório mantinha um grupo de 188 doadores, cujo soro sangüíneo não possuía anticorpos para o vírus da febre amarela. Eram chamados quando necessário para fornecer entre 200 e 400 c.c. de sangue, dependendo do peso do doador, resguardando-se um intervalo de mais de trinta dias entre as sangrias. Os frascos com sangue eram mantidos no frio durante 24 horas, para que as partes sólidas decantassem e o soro, ou grande parte dele, fosse aspirado. O resíduo era extraído por centrifugação. O soro de três a oito doadores era misturado e mantido em banho-maria em água a 56ºC, por duas horas, para a "inativação". Depois, era filtrado em disco de Seitz. Submetia-se ainda uma amostra à prova de proteção, para confirmar a ausência de anticorpos ao vírus da febre amarela. As misturas de soro eram numeradas em série, registrando-se num livro os dados relativos a cada uma: datas de sangria, doadores, inativação, resultados da prova de proteção e destino dado ao material.



Aparelho usado para sangrias humanas e obtenção do soro usado na preparação da vacina. O sangue era recolhido em frascos Kitasato graduados por sucção obtida por meio do aparelho mostrado na imagem. Consistia numa bomba pneumática com ação invertida, um reservatório cilíndrico para baixa pressão e um manômetro de mercúrio. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Após a crise de 1939-40, algumas providências foram tomadas com o objetivo de "diminuir a possibilidade de contaminação dos soros com o agente da icterícia pós-vacinação". Passou-se a extrair dos doadores, primeiro, uma amostra de 5 c.c. de sangue para se verificar, imediatamente, o "índice icterício". Se fosse maior do que cinco, era dispensado. Se estivesse dentro de limites aceitáveis, sangravam-no. Após uma primeira filtragem, o soro era guardado por sessenta dias sem ser misturado aos outros. A mistura, inativação e a nova filtragem só ocorriam se, no fim desse período, o doador não houvesse tido nenhuma doença intercorrente, e se novas provas de índice ictérico fossem normais (*Manual da vacina,* pp. 61-3).

No começo de 1942, a preparação do suco de embrião foi modificada com o objetivo de reduzir as contaminações, adotando-se aquele sistema de "sublotes" a que nos referimos. Ao serem retirados dos ovos, os embriões passaram a ser reunidos em grupos de cinqüenta a oitenta em copos Pyrex. Cada grupo era levado separadamente ao moinho coloidal que, em dezembro de 1941, substituiu o de bolas, o que resultou em melhor e mais rápida trituração. O aparelho era lavado com solução salina antes de cada trituração, processando-se cerca de trezentos embriões. As pastas resultantes eram recolhidas em frascos de Erlenmeyer e congeladas por imersão em álcool refrigerado com neve de dióxido de carbono. A armazenagem se fazia em marmitas térmicas contendo neve carbônica.

O aperfeiçoamento dessa operação foi uma das decorrências da supressão da filtragem, feita antes mesmo de suprimir o soro. A problemática das contaminações forçou o deslocamento da centrifugação dos embriões triturados para momento posterior, como veremos.

O teste para verificar a contaminação bacteriana do material triturado tornou-se mais rigoroso. Para cada grupo de embriões, reservavam-se, agora, dois balões com caldo estéril, nos quais se pingavam três gotas da pasta triturada; 48 horas depois, os balões eram examinados para ver se havia proliferado algum microrganismo. As pastas estéreis eram degeladas por imersão dos frascos em água tépida (37ºC), caso fossem servir para o preparo imediato de vacinas, ou continuavam na câmara fria para serem usadas quando necessário.

Moinho coloidal usado na trituração dos embriões, adotado a partir de 1942 em substituição ao moinho de bolas. A nova máquina era capaz de triturar melhor e em menos tempo. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Copos metálicos com capacidade de receber cerca de cinqüenta embriões para trituração, realizada por peça metálica provida de palhetas de bordas cortantes, capazes de girar em alta velocidade, quando acionado o motor na base que as sustenta. Rio de Janeiro, RJ, 1946.
Manual de Instruções Técnicas e Administrativas do Serviço Nacional de Febre Amarela/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Não havia gelo seco no Rio de Janeiro nos anos 1940. Era preciso fabricá-lo no laboratório, com cilindros de gás carbônico (CO_2) comprimido. A descrição de 1956 já faz menção à refrigeração mecânica — uma máquina industrial da Deepfreeze International Corporation (Chicago, Illinois), capaz de manter uma temperatura de -85ºC. A máquina fora adaptada a bomba e tubos para permitir a distribuição do fluido de convecção[17] — cerca de duzentos litros de álcool — a todos os aparelhos que necessitavam de refrigeração.

Penna encomendou essa máquina durante uma visita aos Estados Unidos, em junho de 1945, para "verificar os aperfeiçoamentos de técnica introduzidos recentemente no preparo da vacina no laboratório de Nova York e adquirir aparelhagem moderna" ("Relatório de atividades da Seção de Vacina". jan./dez. 1945).

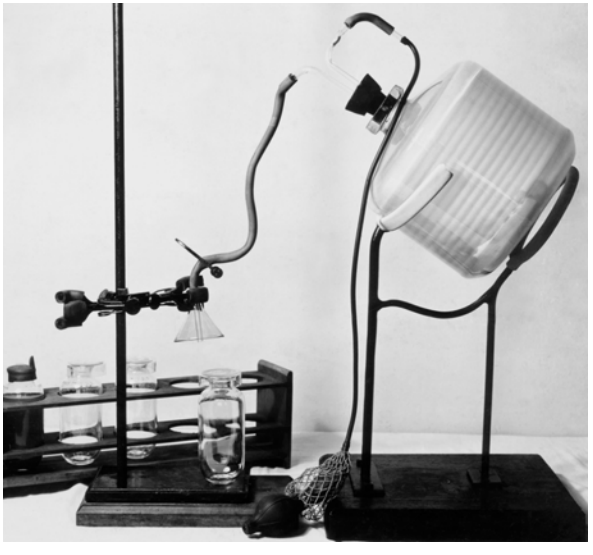
A Deepfreeze chegou ao laboratório em abril de 1946 e deu problema já no primeiro dia: parte da carga de gás Freon escapara durante a viagem e a máquina gelava mal. Recarregada, trabalhou satisfatoriamente por alguns dias, até notar-se que o gás continuava escapando. O funcionamento da máquina foi novamente interrompido, enquanto se tentava descobrir o vazamento. Em outubro de 1947, o preparo da vacina teve de ser interrompido, para que fosse consertado o aparelho de refrigeração. "O estoque da vacina é suficiente para atender qualquer pedido, possibilitando, assim, essa parada de trabalhos" ("Resumo de atividades do laboratório" em 1947). A Deepfreeze parou outra vez em agosto de 1949, interrompendo a preparação da vacina durante quase todo o mês.

Após a centrifugação do suco embrionário, colheita, por aspiração, do líquido sobrenadante. Rio de Janeiro, RJ, década de 1960.
LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

"O maior acontecimento no laboratório durante o ano de 1949" — anotou Penna em seu *Diário* — "foi a instalação de um quarto frigorífico destinado à conservação dos lotes de vacina em temperatura de cerca de 30ºC abaixo de zero. A montagem do aparelhamento feita pela GE não foi considerada, entretanto, satisfatória, principalmente por não se fazer o degelo como deveria, o que resultava no acúmulo de gelo nos evaporadores. O mecânico do SEPFA alterou a instalação nos pontos onde se fazia necessário, conseguindo funcionamento adequado".[18]

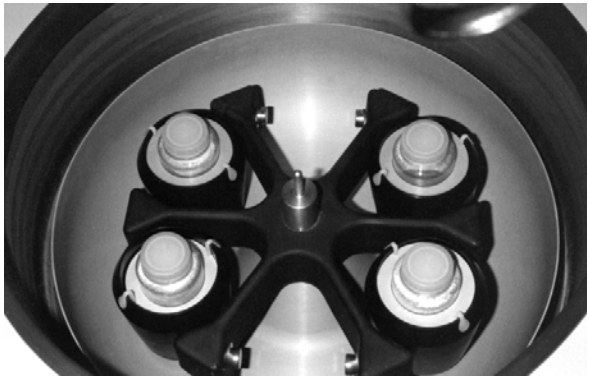
Em 1952, ano de maior produção de vacina desde a fundação do laboratório, o refrigerador Deepfreeze não suportou a carga, e foi preciso recorrer à neve carbônica ("Relatório anual da Seção de Febre Amarela", 1952). Em abril de 1955, foram instaladas novas máquinas de refrigeração. Menos de um ano depois, a produção foi interrompida de novo, dessa vez por quase dois meses (fevereiro e março de 1956), por ter havido escapamento de gás Freon, que não se achava no Rio de Janeiro, e que teve de ser importado dos Estados Unidos. Os problemas com a aparelhagem de refrigeração prosseguiram por pelo menos duas décadas ainda, acarretando não apenas constantes interrupções no processo produtivo, como queda na titulação da vacina e conseqüente perda de lotes, devido às oscilações de temperatura ("Resumo das atividades da Divisão de Vírus", 1959).

A trituração dos embriões, em 1956, era feita em aparelhos elétricos chamados *warring blendors*, muito parecidos com os liqüidificadores de uso doméstico que conhecemos. Funcionavam muito melhor do que os refrigeradores, executando a trituração em apenas seis minutos (Penna, 1956, p.74). Retirava-se uma amostra (1,0 ml) de cada triturador para teste de esterilidade, e se transferia o restante do material para garrafas Pyrex de um litro, que eram hermeticamente fechadas, numeradas e, em seguida, colocadas dentro de uma caixa provida de rolos que um motor elétrico fazia girar. Álcool gelado na máquina frigorífica era bombeado para dentro dessa caixa e escoava de volta para o refrigerador, em circulação contínua. As garrafas, apoiadas horizontalmente sobre os rolos, giravam por alguns minutos, expondo seu conteúdo ao banho em álcool a -80ºC, até que a polpa de embrião congelasse uniformemente, formando um cilindro oco aderido à parede interna. Além de acelerar a congelação e o descongelamento, este método, ainda em uso, contribuiu para a conservação do título do vírus. A unidade frigorífica e, às vezes, outra sobressalente, possuíam um compartimento em que as garrafas com polpa congelada eram armazenadas à mesma temperatura, por 48 horas ou período maior, que podia chegar a dez dias, até que saíssem os resultados dos testes de esterilidade e se descartassem as polpas contaminadas. (ibidem, p.75-6) As 'saudáveis' eram descongeladas, imergindo-se as garrafas em água a 30ºC. No quarto à prova de poeiras, uma bomba aspirava as polpas para dentro de um grande frasco de filtragem, de onde eram distribuídas para recipientes de 250ml, que descreviam duas mil revoluções por minuto, durante uma hora, numa centrífuga refrigerada (2º a 5ºC). O límpido líquido sobrenadante, equivalente, em geral, à metade do volume da polpa, era a vacina.

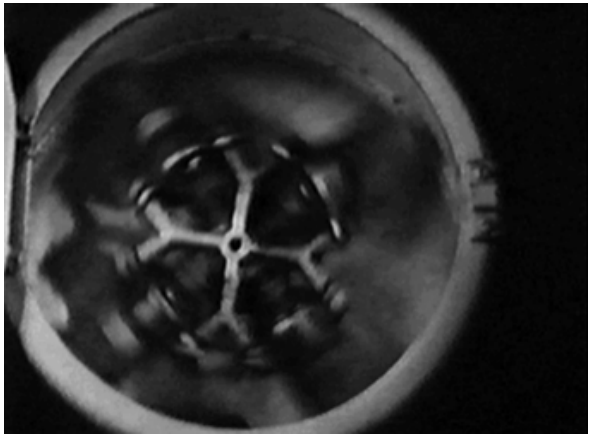


Aparelho para a retirada da suspensão ou suco de embriões do frasco triturador. Após a adição de soro humano à massa embrionada, a suspensão é distribuída em tubos para centrifugação. A transferência é realizada por meio de pressão de ar obtida com o auxílio de uma pêra insufladora, a qual expele o líquido através de um tubo que atinge o fundo do frasco. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/ LAFA/Bio-Manguinhos/ Fiocruz

Dispositivo especial que imprime aos vidros contendo polpa embriônica um movimento de rotação lento, enquanto permanecem parcialmente imersos em álcool refrigerado a uma temperatura de cerca de 70ºC abaixo de zero. O objetivo da operação é formar, nas paredes laterais dos frascos, uma fina camada de pasta congelada que será armazenada em refrigerador especial. Rio de Janeiro, RJ, 1946.
Manual de Instruções Técnicas e Administrativas do Serviço Nacional de Febre Amarela/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz



Aspecto interno da máquina centrífuga, cuja função é realizar a separação, na pasta embrionária contida nos frascos, do material descartável constituído por fragmentos de tecido que vão ao fundo, e da suspensão viral propriamente dita, o líquido sobrenadante. Rio de Janeiro, RJ, Década de 1970.
Álbum LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

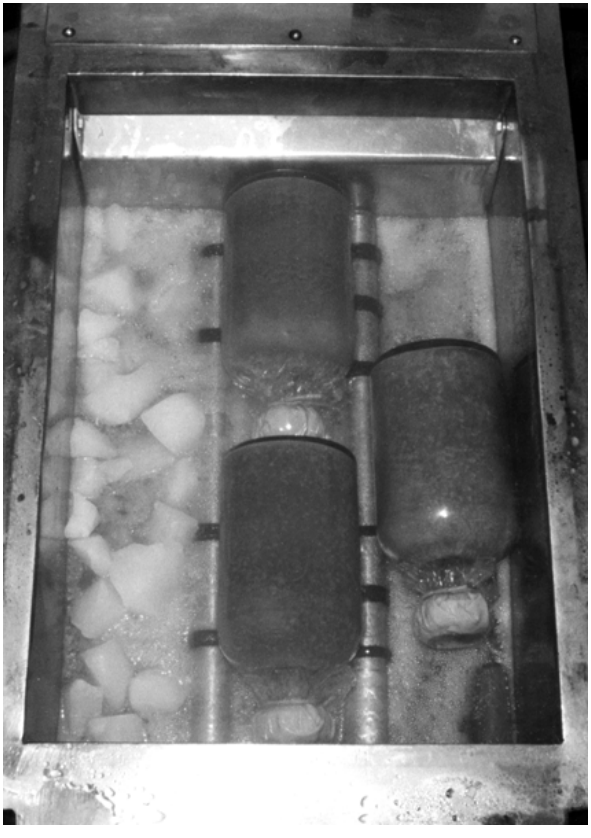


Centrífuga em funcionamento. Rio de Janeiro, RJ, 1939.
Vídeo Preparação da vacina de febre amarela/Cinemateca Brasileira

O processo atual é basicamente o mesmo. Após a trituração dos embriões, o conteúdo de cada dois copos é transferido para um frasco centrífugo de 1.000 ml, e centrifugado durante uma hora a uma temperatura de 4ºC a 8ºC. O sobrenadante é aspirado, por pressão negativa, para um frasco de vidro de 1.000 ml. A principal novidade reside na inclusão de estabilizadores, em quantidade proporcional ao volume recolhido. Como todo imunizante constituído de vírus vivo, a vacina contra a febre amarela era extremamente vulnerável ao calor e às variações térmicas em geral. Este problema crônico só foi minimizado nos anos 1980, quando se incluiu na formulação da vacina um complexo estabilizador concebido pelos técnicos do Laboratório de Desenvolvimento de Bio-Manguinhos.

De cada frasco, são retiradas amostras para testes de potência e para se verificar contaminação com vírus, fungos e bactérias, especialmente a *Micobacterium tuberculosis*. Os frascos são hermeticamente fechados e identificados com um número de série, registrando-se o volume final de cada um. A suspensão viral estabilizada é, então, congelada em banho de álcool e gelo seco, num aparelho idêntico àquele

que descrevemos acima. Em vinte minutos de rotação, forma-se o cilindro oco, aderente às paredes dos frascos, que são armazenados a –70ºC até serem liberados pelos técnicos do Controle de Qualidade.



Congelamento do bulk vacínico. A técnica consiste em imergir parcialmente os frascos contendo o caldo embriônico em solução de álcool refrigerado e mantê-los em rotação, para que o congelamento se dê por finas camadas que vão aderindo à parede interna do frasco. Década de 1970.
Álbum LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

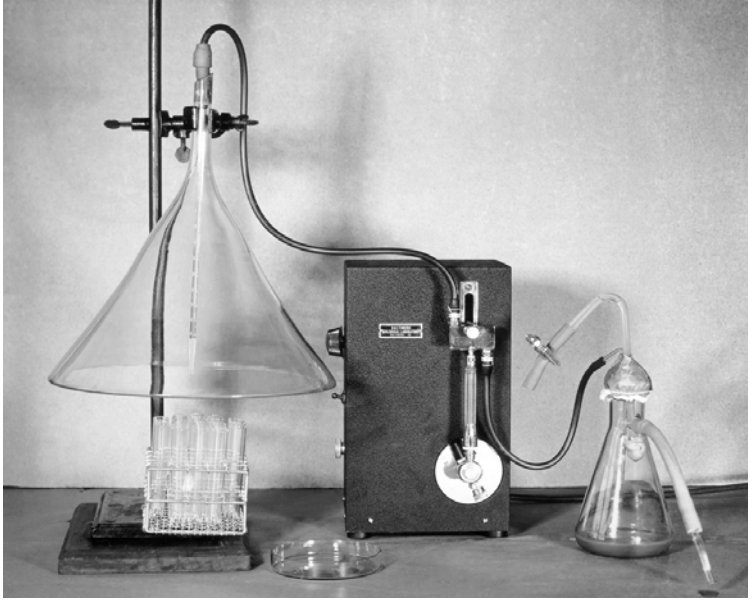
O descongelamento se faz ainda em banho-maria, a 31ºC. Depois de sofrerem assepsia externa com álcool 70% iodado, os frascos são levados à área biolimpa, onde a suspensão viral contida em cada um é transferida para um único recipiente, retirando-se amostras para novos testes de esterilidade e potência. O *pool* formado nesse recipiente é a vacina a granel, pronta para ser envasada ou, como se dizia, "distribuída".

Envasamento da vacina

Em 1941-42, essa operação era realizada com todas as precauções de assepsia possíveis à época, no quarto à prova de poeiras. As vacinas com soro humano, filtradas ou não, eram "distribuídas" em volumes de 3 c.c., em ampolas com capacidade para 20 c.c., e a nova vacina sem soro, em volumes de 0,5 c.c. por tubo de 16 x 100 mm. Em 1956, as ampolas, feitas de Pyrex ou vidro similar, com 15 mm de diâmetro, tinham um longo gargalo que elevava o seu comprimento a 1,40 cm. Tubos e ampolas eram tampados com mechas de algodão bem frouxas, de maneira a não criar obstáculo à operação seguinte, a dessecagem da vacina, precursora da atual liofilização.

O equipamento para envasar resumia-se a uma bureta de vidro ligada ao frasco com vacina. Os tubos ou ampolas eram manipulados pelo operador, que flambava a boca de cada recipiente antes de enchê-lo, retirando e recolocando as mechas de algodão. Em 1942, empregava-se já uma pipeta automática, que podia ser ajustada para descarregar o volume desejado nos tubos ou ampolas. Sendo muito alta a velocidade para que fossem manuseados individualmente, eram arrumados em suportes com capacidade para 21 recipientes, cobertos com a tampa de uma placa de Petri até a hora do enchimento. Quando os tubos ou ampolas estavam cheios, eram tampados, um a um, com algodão estéril transferido de recipientes em duplicata colocados ali com essa finalidade. Parte do material era separada para as provas bacteriológicas, e para se verificar, por meio do chamado teste de potência, se a armazenagem dos embriões tinha afetado a concentração de vírus vivos.

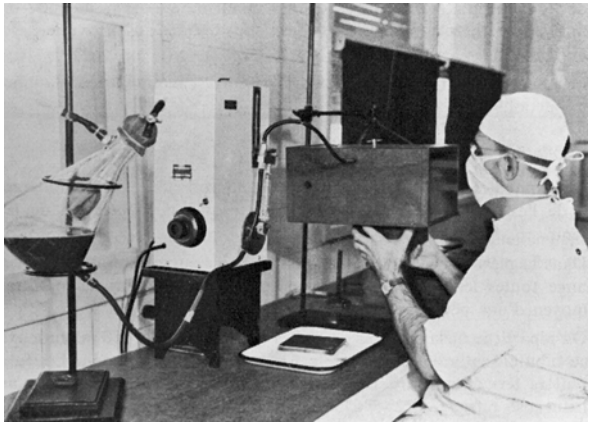
Bureta para distribuição da vacina nas ampolas. A proteção de vidro em forma de campânula, que se vê na extremidade da bureta, tinha por função evitar a contaminação da ampola por poeiras, no momento em que era preenchida.
Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz



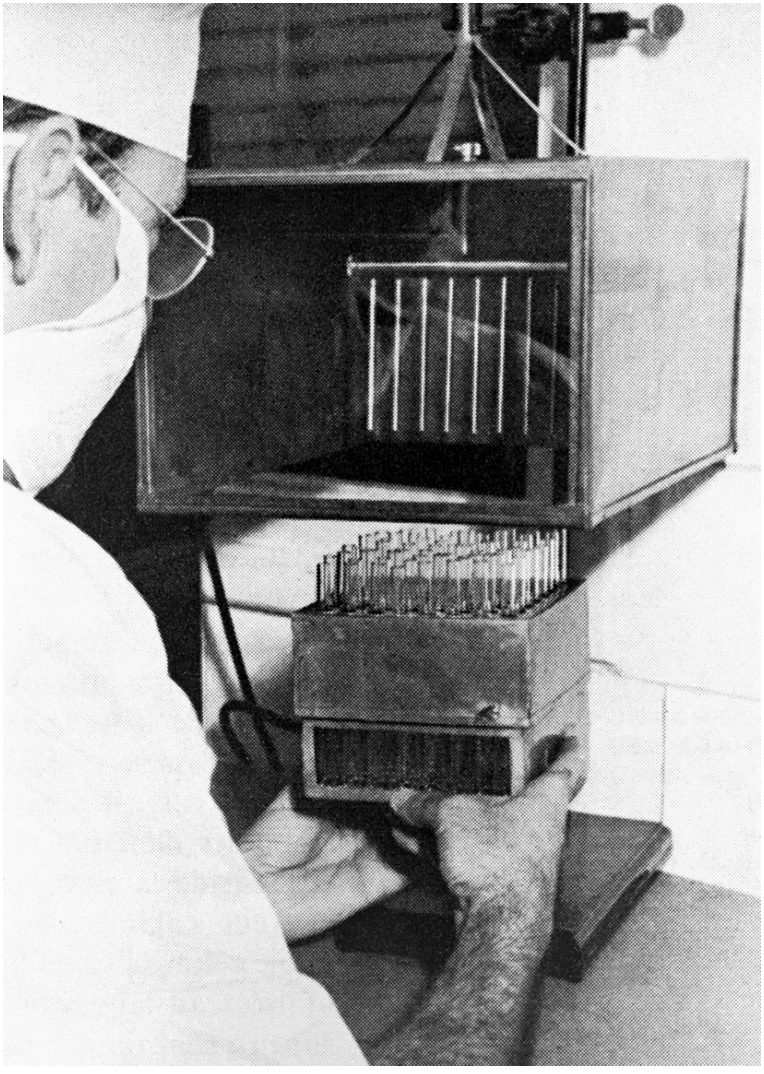
Máquina de pipetar automática para distribuição da vacina. O processo agora automatizado permite o ajuste do volume distribuído. Um protetor de vidro em forma de funil tinha a função de evitar contaminações na ponta do tubo de distribuição (a ponta de descarga) e nos outros tubos que preenchia. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Dispositivo mais moderno, adotado no pós-guerra, para envase da vacina, no qual se gastavam vinte minutos para encher mil tubos de 0,5 c.c.
Rio de Janeiro, RJ, 1946.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

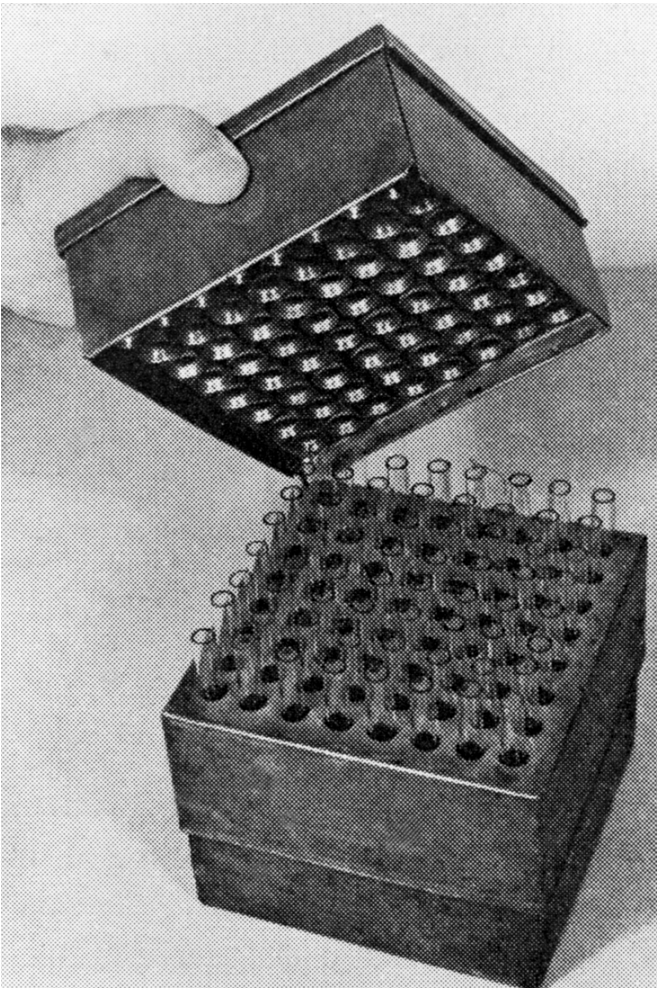
Em 1956, o processo se havia automatizado um pouco mais. O frasco que recebia o líquido resultante da centrifugação das polpas de embrião estava conectado a uma máquina de pipetar provida de um dispositivo de jato múltiplo que permitia encher, simultaneamente, oito ampolas. Estas ficavam em pé, em caixas de metal que comportavam oito fileiras com oito ampolas cada. Quando o operador pressionava um pedal, quantidade predeterminada de vacina era injetada nas ampolas de uma fileira, e assim sucessivamente, até serem preenchidas as 64 da caixa. O próximo operador acionava um dispositivo que introduzia as mechas de algodão estéril. Fora projetado de maneira a sobrepor-se à caixa que continha as ampolas cheias. Possuía, também, 64 tubos metálicos, na vertical, com diâmetro ligeiramente maior do que os gargalos das ampolas, e quando se dava o encaixe, a mecha de algodão era transferida dos tubos para as ampolas com o auxílio de um pente com oito pontas, que empurrava as mechas até a profundidade de 1 cm da borda das recipientes com vacina.



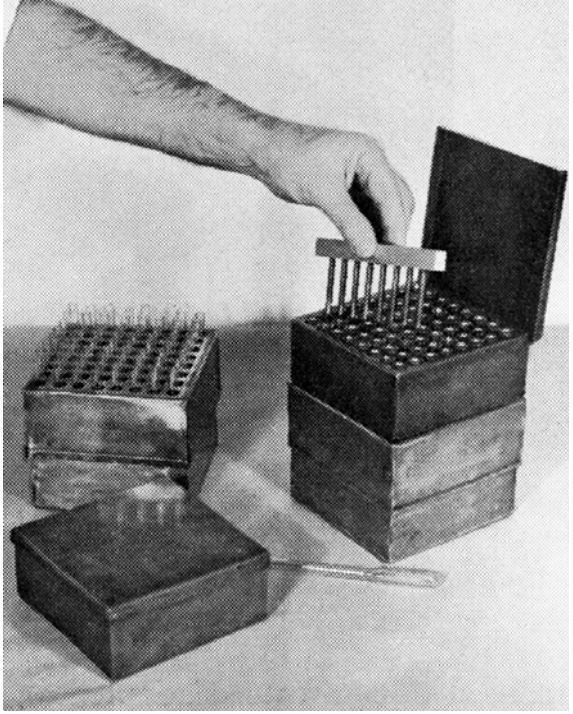
Visão geral da mesa de envase: as ampolas acondicionadas num suporte especial são abastecidas por um aparelho de múltiplo jato, conectado automaticamente à máquina de envase. Rio de Janeiro, RJ, 1956.
Penna, 1956, p. 78



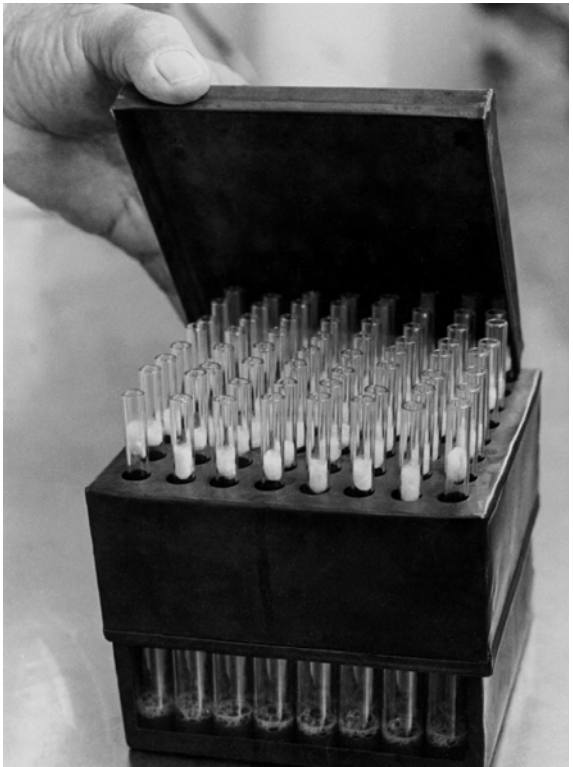
Enchimento de ampolas. O aparelho que as abastece possui janela de vidro, através da qual o operador vê o suporte que tem de encaixar. Rio de Janeiro, RJ, 1956.
Penna, 1956, p. 79



Procedimento para tampar os tubos de vacina com chumaços de algodão. Estes são empurrados para dentro dos tubos, uniformemente, por meio de um pente, depois de acoplar-se a peça superior, que contém os algodões, na peça inferior, que sustenta os tubos. A terceira foto mostra os tubos já vedados com algodão, prontos para ingressarem na etapa da dessecação. O dispositivo foi desenvolvido por um mecânico habilidoso e inventivo de origem austríaca, o sr. Hans, que dava corpo a muitas das inovações concebidas por Henrique Penna. Durante a guerra, Hans foi expulso do Brasil, mas depois trouxeram-no de volta, porque era um artesão insubstituível. Rio de Janeiro, RJ, 1956.
Penna, 1956, p. 81

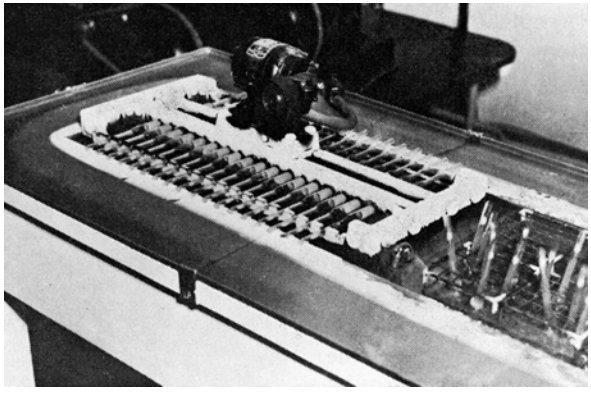


Penna, 1956, p. 81



Década de 1960.
Acervo LAFA/
Bio-Manguinhos/Fiocruz

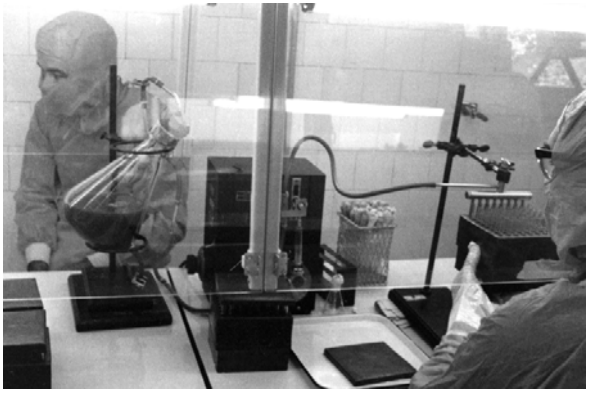
Com a ajuda desses aparelhos, na sala à prova de poeiras, os dois operadores podiam encher e tampar mil ampolas em menos de 15 minutos (Penna, 1956, pp. 77, 80-1). A vacina envasada era então congelada por processo idêntico àquele utilizado com as garrafas que continham embrião triturado, e nesse estado ingressavam na etapa subseqüente, da dessecação.



Congelamento das vacinas em ampolas. A técnica denominada *shell-freezing* consiste em manter as ampolas em movimento rotativo, para que o congelamento se efetue por finas camadas aderidas à parede interna dos frascos.
Rio de Janeiro, RJ, 1956.
Penna, 1956, p. 82

Hoje, o envasamento da vacina contra a febre amarela é um processo inteiramente automatizado. A máquina que distribui a vacina a granel, depositando, em intervalos regulares, 0,55 ml, ou cinqüenta doses, em cada frasco de vidro, opera debaixo de um módulo de fluxo laminar, classe 100, filtra todas as partículas presentes no ar, tornando o ambiente muito mais asséptico do que a antiga "sala à prova de poeiras".

Os frascos são parcialmente fechados com tampas de borracha butílica lavadas, revestidas com silicone e esterilizadas, antes de serem transferidos para os liofilizadores industriais de alto vácuo, versão tecnologicamente superior aos antigos dessecadores que operavam numa escala muito menor, e à custa de trabalhosas manobras manuais que expunham a vacina a contaminações freqüentes e a uma secagem imperfeita.



Envase da vacina. Rio de Janeiro, RJ, década de 1970.
LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Dessecação e selagem dos tubos e ampolas

A rápida sucessão de técnicas experimentadas no período 1941-42 para extrair a água da vacina mostra que essa era uma das etapas mais problemáticas do processo de fabricação. Em linhas gerais, um dessecador era um recipiente fechado no qual se colocava a substância a dessecar e uma substância higroscópica — anidrido fosfórico, ácido sulfúrico concentrado, hidróxidos de potássio e sódio ou outro material que tivesse grande afinidade pelo vapor de água, sendo capaz de retirá-lo de uma atmosfera ou eliminá-lo de uma mistura gasosa. O processo era acelerado fazendo-se o vácuo no recipiente, já que num ambiente com pressão inferior à atmosférica e ausência de oxigênio, a água contida na substância a dessecar

entra em ebulição mais rapidamente e numa temperatura mais baixa do que a requerida no ambiente externo. No caso da vacina, a necessidade de preservar o vírus vivo, protegendo-o do calor e de variações térmicas, exigia que a dessecação fosse feita a frio.

A técnica original descrita por Sawyer, Lloyd e Kitchen (1929, p.1-13) utilizava ácido sulfúrico e imersão em mistura de sal e gelo. Havia uma preparação prévia. Uma hora antes, colocava-se o dessecador de vidro tipo Hempel num banho refrigerante de sal grosso e gelo. Na tampa do aparelho introduzia-se o agente de dessecação: aproximadamente 130 c.c. de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos com vacina, por sua vez, eram congelados em banho de álcool-CO_2, tendo-se o cuidado de movimentá-los circularmente de maneira a espalhar o material e formar uma camada uniforme. Os tubos com a vacina congelada eram arrumados num suporte e mergulhados numa camada de glicerina posta no fundo do dessecador, para que mantivessem a mesma temperatura da mistura de sal e gelo. Tampava-se o dessecador e acionava-se a bomba elétrica, até que se escutasse "a pancada característica que se nota quando o vácuo é quase perfeito" (*Manual da vacina*, p. 44).

Aparelho de dessecação da vacina, usando vácuo e ácido sulfúrico em mesa refrigeradora. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/ LAFA/ Bio-Manguinhos/Fiocruz

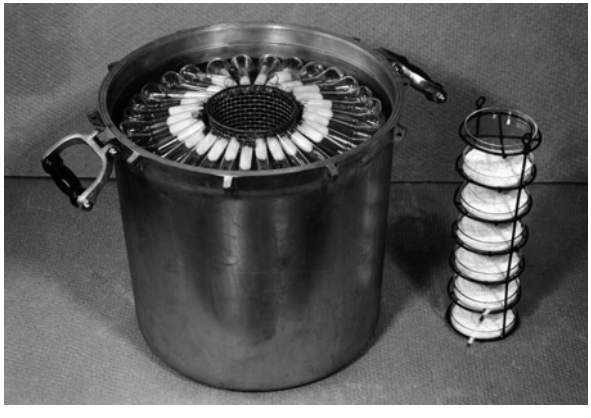
O dessecador, ainda banhado em gelo e sal, permanecia no quarto frio por 18 a 20 horas, com a bomba funcionando ininterruptamente para "compensar os pequenos vazamentos do sistema". Depois era descongelado por simples exposição à temperatura ambiente. Antes de abri-lo, introduzia-se ar previamente dessecado por passagem através de cloreto de cálcio ($CaCl_2$). Os tubos com vacina eram retirados e selados.

Para evitar o penoso trabalho de se colocar gelo e sal à volta de tantos dessecadores, construiu-se uma mesa refrigeradora, cujo tampo continha solução de cloreto de cálcio mantida a -10ºC por meio de corrente elétrica. As bases dos dessecadores ficavam imersas no líquido frio, por 24 a 48 horas. Esse método não deu resultados muito bons, porque o ácido depositado na tampa de cada aparelho ficava exposto à temperatura relativamente alta do ambiente. Quando se demonstrou que a evaporação da vacina era suficientemente rápida para que ela se mantivesse congelada durante as primeiras etapas da dessecação, abandonaram-se as tentativas de manter as bases dos aparelhos em temperatura abaixo do ponto de congelação. Pelo novo método, o material a dessecar era congelado da maneira descrita acima e colocado no dessecador, que recebera o ácido sulfúrico mas não a glicerina. Com a bomba Megavac, obtinha-se bom vácuo em vinte minutos. Os dessecadores eram levados ao quarto frio, onde ficavam expostos a -5ºC, até a hora de serem abertos. As etapas subseqüentes eram as mesmas.

Verificou-se, porém, que, na fase final, a eficiência do ácido sulfúrico era prejudicada pela diluição que sofria com a primeira água desprendida pela vacina. Fez-se, então, outra modificação na técnica. A dessecação passou a ser interrompida depois de 24 horas para que o ácido semidiluído fosse substituído por ácido novo, concentrado. Tampavam-se os dessecadores, refazia-se o vácuo e os aparelhos eram levados de volta ao quarto frio, por mais 24 horas. Esse processo dava bons resultados quando os volumes a dessecar não ultrapassavam 40 c.c. por dessecador. Para quantidades maiores, era necessário usar tantos aparelhos que se tornavam inevitáveis as variações, às vezes grandes, no grau de dessecação num mesmo lote de vacina.

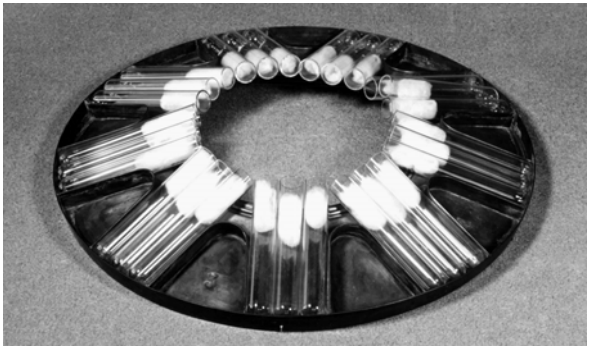
Após a filtragem e distribuição da vacina em ampolas, processa-se o congelamento num banho de álcool em temperatura muito baixa, obtida com neve carbônica. As ampolas com a vacina congelada são transferidas para os dessecadores que operam com vácuo e ácido sulfúrico na mesa exibida na página anterior.
A dessecação, imperfeita, demora de 24 a 48 horas.
Rio de Janeiro, RJ, 1939.
Filme Preparação da vacina da febre amarela/Coc/Fiocruz

Em 1940, foi adotado, com algumas modificações, o método descrito por Bauer e Pickles (1940, pp. 83-8) — dessecação com condensador de baixa temperatura e óxido fosfórico (P_2O_5) — que permitia processar grandes volumes de vacina uniformemente, utilizando-se um único aparelho.



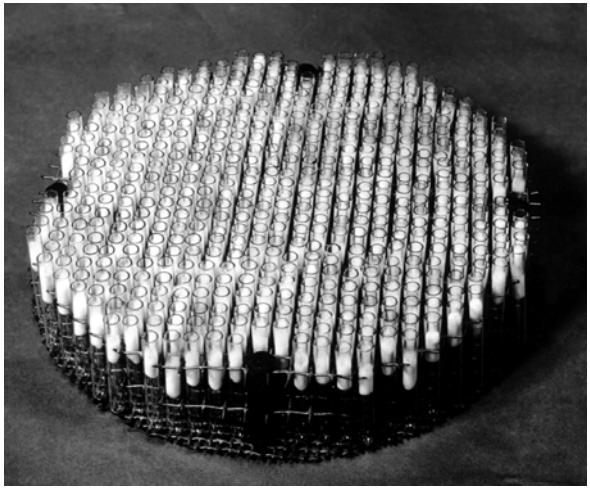
Modelo de dessecador que substituiu o anterior, de alumínio invertido, medindo 38 x 39 cm, com tampa torneada em duralumínio, contendo as ampolas com vacina e os tampões de algodão. Do lado de fora, vê-se o suporte que recebe a substância higroscópica (óxido fosfórico). Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

O novo dessecador era um caldeirão de alumínio medindo 38 x 39 cm, com tampa torneada em duralumínio. O fechamento hermético era obtido por pressão atmosférica, quando se fazia o vácuo no seu interior. As ampolas eram arranjadas em bandejas de cobre, radialmente, com as aberturas voltadas para o centro. O dessecador comportava dez bandejas superpostas, com cerca de trinta ampolas cada, perfazendo trezentas ampolas. Os tubos de 16 x 100 também eram dispostos radialmente, mas em bandejas diferentes, cabendo 450 no dessecador. Tubos de 75 x 10 mm eram montados verticalmente no fundo do aparelho, e neste caso cabiam quinhentos.



No interior do dessecador, as ampolas são dispostas radialmente em bandejas de cobre, com a abertura dirigida para o centro. Para tubos de 16 x 100 mm, como os mostrados na imagem, a capacidade do dessecador é de 450 tubos. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

No centro dos anéis com tubos ou ampolas era introduzido um suporte especial com seis tampas de placas de Petri superpostas contendo óxido fosfórico (P_2O_5), substância usada no final da dessecação.



Para tubos de 10 x 75 mm, a capacidade de dessecação aumentava para quinhentas unidades, montadas verticalmente no fundo do dessecador. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

O condensador desempenhava papel importante. Era um cilindro metálico (63 x 10 cm), com tubos de entrada e saída, que ficava mergulhado numa grande "garrafa térmica" tampada contendo mistura de álcool e neve carbônica. Sua função era reter a umidade dos gases que atravessavam aquele cilindro, já que ela condensava, ao entrar em contato com suas paredes geladas. Isso valia tanto para o vapor de água despreendido pela vacina como para os gases que tinham de ser introduzidos no dessecador, na hora de desfazer o vácuo, em substituição ao ar atmosférico carregado de umidade.

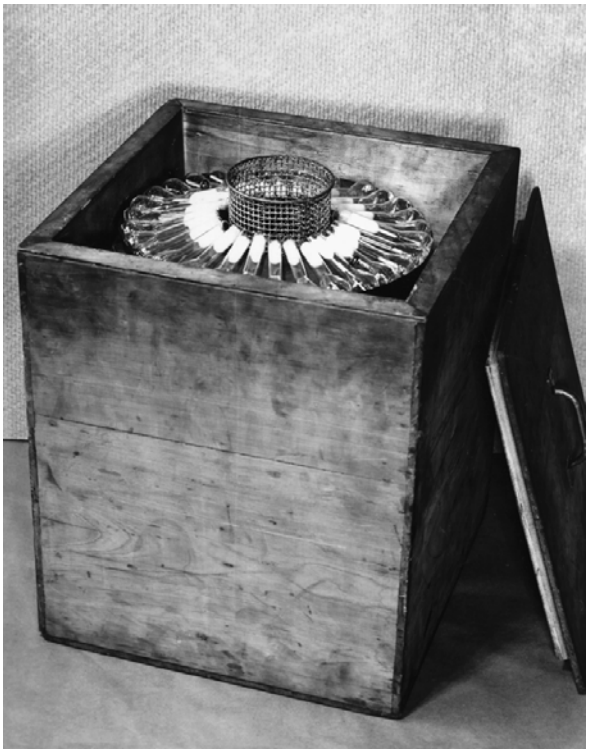
O condensador, cilindro metálico medindo 63 x 10 cm, é mergulhado numa grande "garrafa térmica" tampada, contendo a mistura de álcool e neve carbônica. Os tubos de entrada e saída do condensador são ligados ao dessecador e à bomba de vácuo. Sua função é condensar a humidade do gás introduzido no desse cador.
Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Dessecador, condensador, duas bombas de vácuo Cenco-Megavac e outros componentes do aparelho estavam montados num carro de madeira para facilitar o transporte nas diferentes etapas do processo. Este principiava com o congelamento da vacina. À medida que se enchiam os tubos e ampolas, eram colocados em suportes especiais para imersão em banho congelante de álcool-CO_2, a -75ºC. Não existia, ainda, a máquina com rolos para girar as ampolas, e assim o operador tinha de agitá-las, circularmente, para que o conteúdo solidificasse em camada fina. Isso facilitava depois a reidratação. Enquanto outro operador arrumava os tubos ou ampolas com a vacina congelada no dessecador, este era mantido em neve carbônica dentro de uma caixa de madeira insulada, para que o material não degelasse.

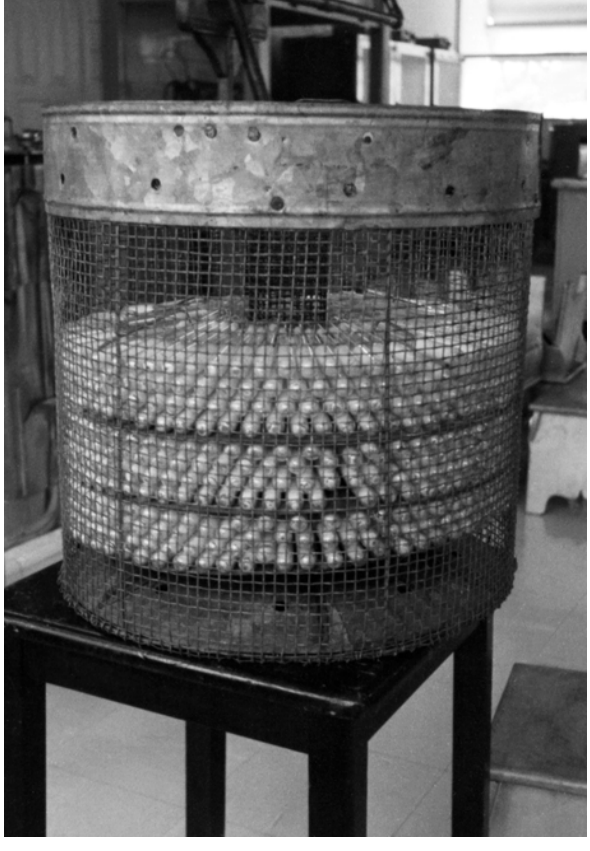
O dessecador era retirado da caixa insulada, tampado e conectado ao condensador. Acionavam-se as duas bombas de vácuo, que produziam a pressão desejada em uma hora, permanecendo ligadas até o dia seguinte. Enchia-se, então, o dessecador com ar que antes atravessava o condensador, deixando nas paredes grande parte de sua umidade, retirava-se a tampa e se introduzia aquele suporte com os recipientes que continham o óxido fosfórico. O aparelho era fechado de novo — tudo isso com muita rapidez — e as bombas voltavam a funcionar. Ao cabo de seis horas, renovava-se o óxido fosfórico, e só na manhã do segundo dia o processo chegava ao fim. Antes de abrir pela última vez o dessecador, injetava-se nele azoto dessecado por lenta passagem através do condensador, que cumpria sua função por estar imerso na mistura gelada de álcool-CO_2.[19]

Hoje, introduz-se nitrogênio ultrapuro e estéril nos liofilizadores industriais de alto vácuo, ao final do processo de desidratação da vacina, por congelação brusca a baixa temperatura seguida de rápida evaporação no vácuo. Os frascos, que contêm o pó fino, muito higroscópico, em que "vegetam" os vírus vivos são tampados com as rolhas de borracha butílica revestidas de silicone, e lacrados com selo de alumínio, antes de serem armazenados em câmara fria, entre 2ºC e 8ºC.

Montagem dos aparelhos — bomba Megavac, dessecador e garrafa térmica que contém o condensador — para o início da operação de dessecação. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943. Manual da Vacina/ LAFA/ Bio-Manguinhos/ Fiocruz

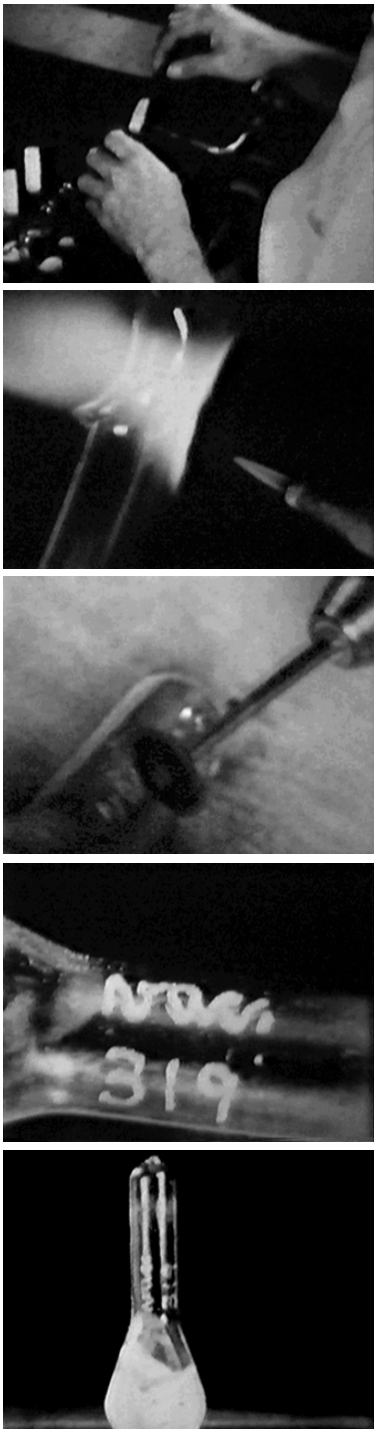


Caixa termicamente isolada para evitar o degelo da vacina antes do início da dessecação. Rio de Janeiro, 1940. The Organization and Detailed Procedures of the Vaccine Division of the Yellow Fever Laboratory/LAFA/ Bio-Manguinhos/ Fiocruz



Ampolas com vacina arrumadas para a dessecação. Década de 1970. Álbum LAFA/ Bio-Manguinhos/ Fiocruz

A selagem dos tubos e ampolas com vacina que acabava de ser dessecada era um processo muito complicado e vulnerável nos anos 1940. Dois ou três operadores tinham de trabalhar muito rápido para que a vacina, altamente higroscópica, não absorvesse a umidade do ar durante o tempo decorrido entre a abertura do dessecador e o fechamento dos tubos ou ampolas. Primeiro, eram arrolhados com cortiça, mas sem se retirarem as mechas de algodão colocadas logo em seguida à distribuição da vacina pelos recipientes. Arrumados em suportes com capacidade para cinqüenta tubos ou 42 ampolas, passavam para as mãos de outro operador, que aplicava a chama de gás-oxigênio. Antes de obturar o recipiente, tinha de remover a rolha de cortiça e puxar a mecha de algodão, mas só até a extremidade, de modo a bloquear a entrada de ar com oxigênio e umidade.



Fechamento ou selagem das ampolas com maçarico. Com um esmeril, grava-se em cada recipiente a data e o número do lote da vacina correspondente. Rio de Janeiro, RJ, década de 1940. Filme Preparação da vacina da febre amarela/ Cinemateca Brasileira

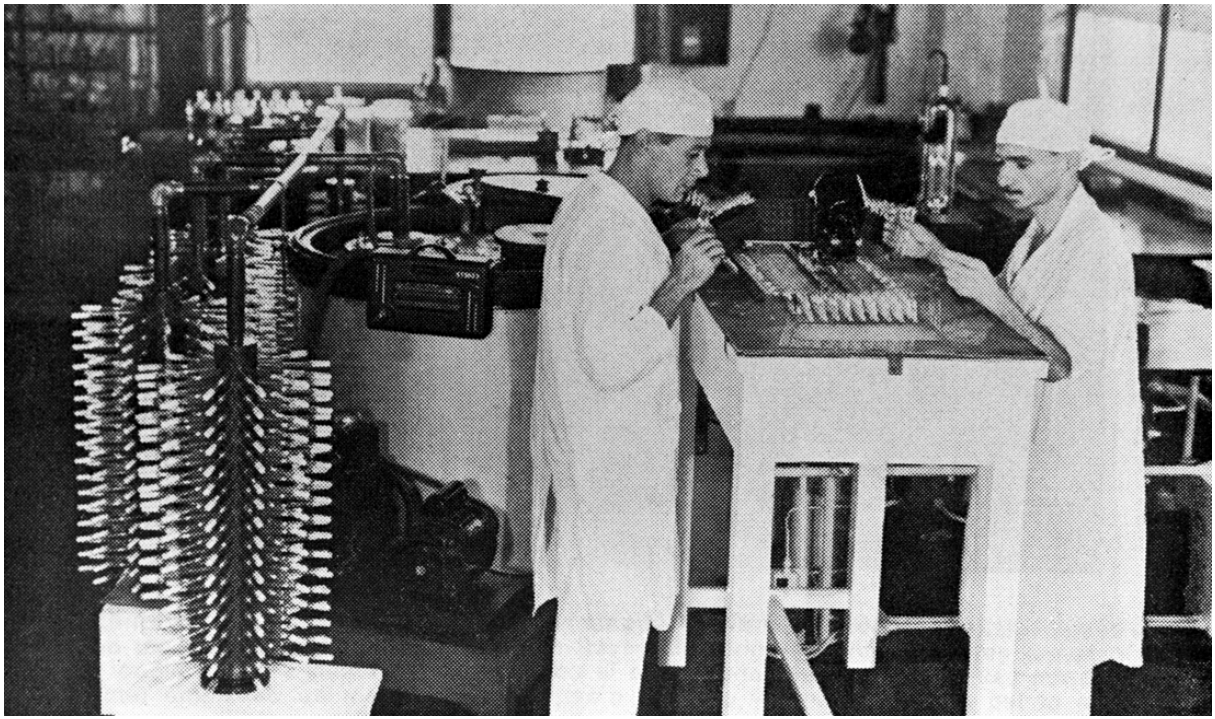
Tubos e ampolas eram marcados com o número e letra do sublote a que pertenciam.[20] Antes de serem armazenados no "quarto frio", separavam-se o primeiro e último recipiente fechado para se fazer o teste que determinava a presença de água residual.

Após a Segunda Guerra Mundial, com a normalização do comércio internacional e a reconversão da indústria norte-americana para fins pacíficos, foram introduzidos vários melhoramentos na aparelhagem utilizada pelo laboratório. Durante o ano de 1947, foi adquirida uma geladeira para preservação do vírus a -30ºC, uma autoclave para esterilização da vidraria e ferramental utilizado na preparação da vacina. A preparação de solução fisiológica tornou-se uma "seção", com sala própria. Dos Estados Unidos importou-se ainda um dispositivo para abrir maior número de ovos na hora de retirar os embriões infectados, e um novo dessecador, que entrou em operação já em agosto de 1946. Um ano depois, começou a ser usado aquele sistema de distribuição que enchia ampolas a cada "pedalada". A instalação, em 1948, de uma câmara frigorífera para preservação da vacina, depois de preparada, à temperatura de -25ºC completou "a série de medidas idealizadas com o fim de melhorar a técnica de preparo da vacina. ... Com esses dois melhoramentos, a secagem mais perfeita da vacina e sua conservação a temperatura mais baixa, acredita-se seja possível no futuro fabricá-la somente durante a época do ano em que há menos dificuldade de obtenção de ovos embrionados, formando assim um estoque que será utilizado até que chegue novamente à época favorável, que é durante os meses menos quentes do ano" ("Resumo das atividades do laboratório" em 1948).

"A partir do lote nº 970, a vacina está sendo dessecada por processo diferente do que vinha até aqui sendo adotado" — escreveu Penna em outubro de 1948 (ibidem). Com o equipamento utilizado a partir de então, certamente aquele descrito em 1956, o vácuo produzido mais eficientemente constituía o principal agente físico do processo de dessecação, subdivido, agora, em dois estágios, que não requeriam mais o uso de dessecante químico.

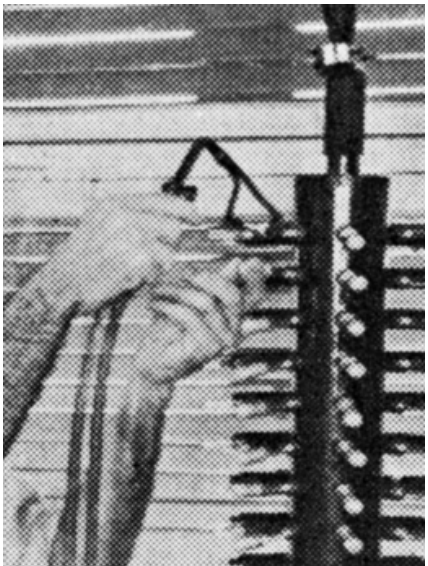
Dessecador da vacina, fechado com tampa de alumínio e ligado por meio de grosso tubo metálico ao condensador que está mergulhado em álcool refrigerado no segundo recipiente. Rio de Janeiro, RJ, 1946.
Manual de Instruções Técnicas e Administrativas do Serviço Nacional de Febre Amarela/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Suporte contendo tubos de vacina para os introduzir em uma câmara metálica que contém álcool mantido em baixa temperatura graças a um refrigerador elétrico especial. O objetivo da operação é dessecar a vacina em estado congelado, para garantir a concentração e eficiência do vírus vacínico. Rio de Janeiro, RJ, 1946.
Manual de Instruções Técnicas e Administrativas do Serviço Nacional de Febre Amarela/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz



Vista geral da sala de dessecação, onde se observa um lote de vacina no estágio final do processo (à esquerda), enquanto as ampolas de outro lote estão sendo congeladas para serem colocadas no dessecador resfriado.
Rio de Janeiro, RJ, 1956.
Penna, 1956, p. 84

O dessecador era de ferro e bem maior: 45 cm de diâmetro e 75 cm de profundidade. Álcool gelado na unidade frigorífica circulava numa serpentina de cobre pela parte externa da câmara dessecadora, garantindo o frio necessário para a conservação do vírus vivo. Uma camada de isolante térmico coberta por fina folha metálica ajudava a conservar ambiente propício àquela operação bioquímica. O dessecador era conectado por um tubo de metal ao condensador, muito parecido com aquele usado em 1942: um cilindro de latão, fechado na base, com duas aberturas na parte superior, uma para a conexão com o dessecador; a outra dando passagem a um tubo que ligava o condensador à bomba de vácuo, uma Hypervac fabricada pela Central Scientific Company, de Chicago.



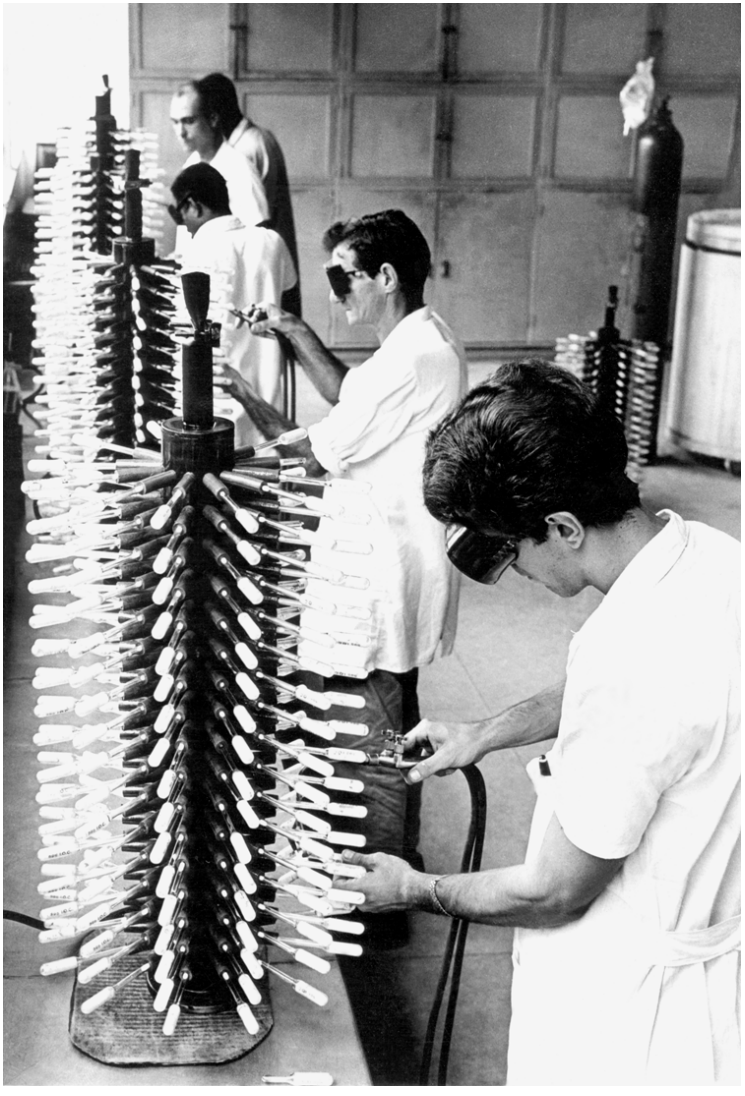
Detalhe da mão do operador no momento em que fecha as ampolas nas "árvores" ou "cachos", com maçarico de fogo cruzado.
Rio de Janeiro, RJ, 1956.
Penna,1956, p. 86

A temperatura do dessecador era regulada para -10ºC, mas quando se obtinha o vácuo e não havia mais risco de degelar a vacina, podia subir vagarosamente. A dessecação prossseguia noite adentro, funcionando a bomba de vácuo sem parar. O condensador — no texto de 1956 chamado também de *cold trap*, armadilha fria — era mantido a -80ºC por imersão no álcool proveniente da unidade frigorífica (Penna, 1956, pp. 82-4).

Esse era o primeiro estágio do processo. No dia seguinte começava o segundo: tratava-se de remover qualquer umidade que pudesse ser absorvida da atmosfera pela vacina seca desde a abertura do dessecador até a selagem das ampolas. Eram usadas, então, estruturas tubulares verticais também chamadas de 'árvores' ou *manyfolds*, um tubo de cobre de 7,5 cm de diâmetro e 75 cm de comprimento, montado numa base pesada de metal para ter estabilidade, com 204 saídas dispostas radialmente. Cada saída era um segmento de tubo de cobre soldado à abertura perfurada no tubo principal. As ampolas eram afixadas a essas saídas por meio de tubos de borracha lubrificados com óleo de rícino. Cinco "árvores" davam conta de um lote de vacina usual, isto é, cerca de mil ampolas.

Através de tubos de metal e juntas de borracha, as estruturas tubulares eram conectadas ao condensador, à bomba de vácuo e a um manômetro de McLeod, processando-se a dessecação em escala menor, em cada recipiente de vacina, através das mechas de algodão que não haviam sido removidas dos gargalos das ampolas. O processo era concluído somente no dia seguinte. O vácuo era interrompido pela introdução de nitrogênio seco, e as estruturas tubulares, removidas para o lugar onde as ampolas eram seladas com um maçarico de oxigênio de dupla chama.[21] Depois de inspecionadas e numeradas, eram armazenadas a -25ºC.

> No novo processo, são usadas ampolas de feitio diferente — escrevia Penna em 1948 — que permite serem elas seladas com maçarico enquanto ainda ligadas ao aparelho de dessecação ... Pelo processo até então empregado, embora fosse facilitada a secagem da vacina distribuída em grande número de ampolas contendo pequeno volume em cada uma, não era possível obter



Fechamento das ampolas nas "árvores" ou "cachos". Rio de Janeiro, 1966.
Álbum LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

> água residual abaixo de 1%, medida pelo processo do P_2O_5 no vácuo. Muitas vezes mesmo essa unidade residual chegava até 2% ... Pelo novo método, consegue-se com facilidade um teor de água residual de 0,5 %, na maioria das vezes, chegando-se mesmo a obter valores bem abaixo desse.

Um dos testes de rotina do laboratório de febre amarela tinha por objetivo determinar a água residual presente na vacina após a dessecação, já que ela encurtava o tempo de conservação do vírus, especialmente quando a vacina era levada a campo. O teste era feito com o material contido no primeiro e último tubo ou ampola selados de cada lote que se fabricava. Em linhas gerais, consistia em verificar-se o peso perdido por essas amostras quando submetidas à temperatura de 110ºC durante certo tempo. Em 1941-42, as vacinas feitas com 100% de soro davam de 1% a 11,2% de umidade. Aquelas feitas com 50% de soro ou com suco de embrião não diluído apresentavam umidade residual de 2% a 2,5%. Lotes feitos com 40% de extrato aquoso de embrião deram 5% a 6% de umidade. Os motivos para estas variações não eram bem conhecidos na época. Supunha-se que estivessem relacionados à "quantidade de material gorduroso volátil que é proporcionalmente maior nos extratos de embrião do que no soro humano" (*Manual da vacina*, p. 70).

O primeiro cuidado a tomar-se era evitar a presença de água residual nos frasquinhos usados no testes. As amostras de vacina seca eram desagregadas, transferindo-se rapidamente o conteúdo do tubo ou ampola para os frascos de teste, que eram tampados e pesados. A diferença entre o peso atual e o do frasco vazio era o peso inicial da amostra. Os frascos, destampados, eram postos em cubas de vidro e introduzidos no forno de secagem, por 18 horas. Esperava-se que o material atingisse a temperatura ambiente para se pesar novamente os frascos, "o mais depressa possível". A perda ocorrida durante o aquecimento representava o peso da água expelida, e era usada para calcular a percentagem de umidade contida originalmente na amostra. Durante o teste, as manipulações tinham de ser feitas com muita rapidez, e sempre com pinças protegidas com borracha, para evitar a interferência da umidade do ar e dos dedos. Era preciso, inclusive, determinar, verificar a todo momento a umidade relativa da atmosfera, pois variações acentuadas podiam comprometer os resultados.

Cuba de vidro com frascos de pesada utilizada para determinação da água residual presente em amostras da vacina dessecada. Rio de Janeiro, RJ, 1941-1943.
Manual da Vacina/LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Titulação

"Além das provas bacteriológicas para controle de esterilidade", — lê-se em Bicca (1988, pp. 162-3) — "procedia-se à titulação de cada lote de vacina para prova de concentração de vírus mediante a inoculação intracerebral em camundongos brancos. Uma amostra de cada lote também era inoculada ainda em macaco *rhesus*, para se verificar qualquer possível aumento do seu viscerotropismo ou neurotropismo".

Em três momentos do processo de fabricação da vacina, — por ocasião da abertura dos ovos para a retirada dos embriões, após a distribuição do líquido vacínico pelos tubos e ampolas e imediatamente após a dessecação — e em sete momentos durante a armazenagem — um, três, seis, nove, doze, dezoito

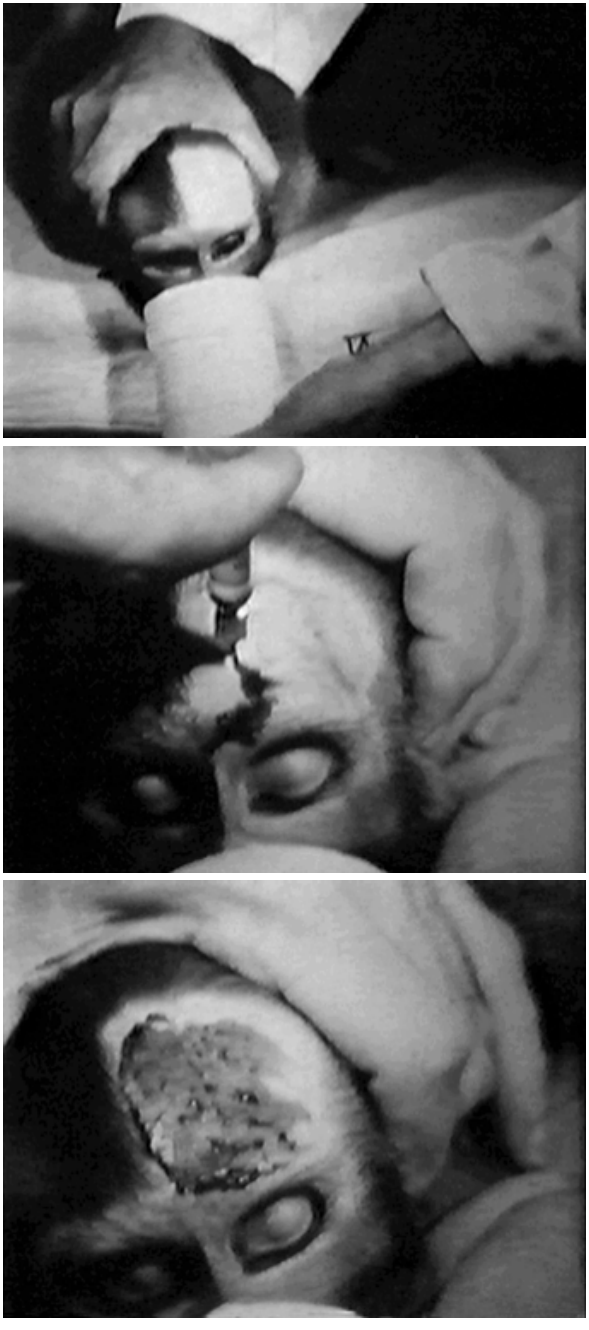
e vinte e quatro meses — era preciso verificar em que estado se encontravam os vírus, que deviam permanecer vivos e com potência suficiente para suscitar no indivíduo vacinado a produção de anticorpos. As operações manuais, químicas e mecânicas, e as condições ambientais podiam danificar a população de vírus existente no meio líquido ou dessecado da vacina.

Chamava-se dosagem ou titulação o controle da vitalidade e potência dos vírus. Em função dela, calibrava-se a diluição em que a vacina ia ser empregada, de maneira a não conter vírus vivos a menos, tornando-se, assim, incapaz de produzir a imunidade, nem vírus demais, que pudessem suscitar reações danosas no homem.

A dosagem ou titulação consistia, essencialmente, no estabelecimento de uma correlação entre determinada diluição do material viral e determinada percentagem de mortes de camundongos inoculados com este material. Havia uma técnica padrão a seguir, mas o rigor de sua execução, por si só, não garantia a qualidade do resultado. A habilidade e intuição do operador eram essenciais, tanto que o *Manual da vacina* (pp. 47A-48) especificava: "dosagens ... só serão feitas por pessoas designadas pelo chefe da seção, porque não se conseguem resultados uniformes com essa técnica senão com bastante experiência".

Usava-se o conteúdo de uma ampola ou dois tubos com vacina dessecada. Os recipientes eram abertos, com precauções de assepsia, e se reidratava a vacina com solução salina fisiológica, em temperatura ambiente, e de novo, com muita rapidez, para que o pó não absorvesse umidade atmosférica. Adicionava-se a solução fisiológica em volume tal que desse uma diluição inicial de 1:10. Somente depois que se obtinha uma mistura bem homogênea, começavam a ser feitas as diluições em série. Em 1941-42, isso era feito com soro humano normal ou de *rhesus* diluído a 1:10 em solução salina fisiológica; em 1956, só se usava o soro fisiológico (NaCl).

Adicionavam-se, então, nove partes desse diluente à vacina reidratada, obtendo-se a proporção 1 para 10. Tomava-se esse material diluído uma vez como unidade, e se acrescentavam



Em acacos *rhesus* são testadas vacinas preparadas no laboratório. A inoculação de vacina, cerca de 0,5 c.c., é realizada em plena massa encefálica após a anestesia do animal, a raspagem da região frontal e sua desinfecção. Munido de um bisturi, o operador abre passagem para a agulha, nessa parte do crânio. Ao final do procedimento, o orifício é fechado com uma gota de colódio.
Rio de Janeiro, RJ, década de 1940.
Filme Preparação da vacina de febre amarela/Cinemateca Brasileira

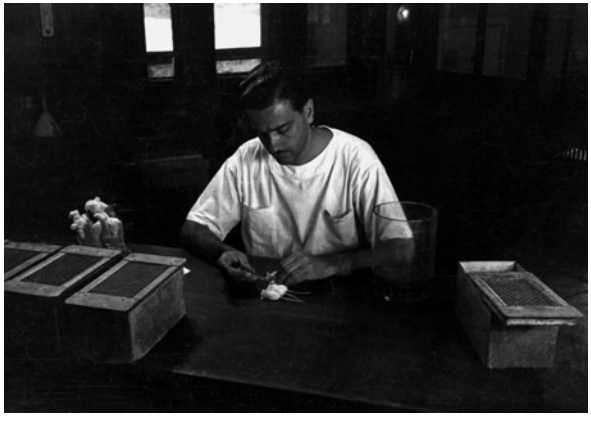
Importava-se da Índia centenas de *rhesus* (Macaca Mullata), muito caros. Em 1935, Henrique Aragão obteve a cessão da ilha do Pinheiro, fronteira ao Instituto, para uma colônia desses animais e de espécies brasileiras como Cebídeos e Hapalídeos. Na "ilha dos Macacos", absorvida depois pela do Fundão, funcionou uma Estação de Hidrobiologia. Com o progressivo aterramento e a ocupação desordenada daquele trecho da Baía de Guanabara, os macacos foram transferidos para as gaiolas da Primatologia, no *campus* de Manguinhos, em 1980. Rio de Janeiro, RJ, 1972. Foto: Luís Alberto e Pedro Paulo Koellreutter. "Manguinhos: a luta contra os inimigos invisíveis". *Manchete*, 19.08.1972, p. 93-8.

nove partes iguais de diluente: obtinha-se agora a proporção 1:100. A operação era repetida cinco ou seis vezes, chegando-se às diluições um (de material virulento) para cem mil ou um milhão (de partes de diluente). Certa quantidade de cada diluição era injetada em camundongos — em 1942, três grupos de seis camundongos; em 1956, 12 animais. No primeiro patamar de diluição, com o vírus ainda bem concentrado, morriam todos. No patamar seguinte, morriam menos. Segundo o *Manual da vacina* (p. 48), o *end point* devia ser bem ultrapassado, sobrevivendo todos ou, pelo menos, quase todos os camundongos na última diluição.

A inoculação dos camundongos, por via intracerebral, requeria cuidados muito especiais. Era nesse momento, sobretudo, que contava a experiência do operador. Pequenas variações de técnica, relacionadas principalmente ao lugar e à profundidade da inoculação, podiam causar diferenças muito grandes no tempo de incubação ou na mortalidade dos camundongos inoculados. Quando estudava a susceptibilidade comparativa de camundongos recém-nascidos, micos e pintos à infecção com o vírus da febre amarela, a dra. Mary B. Waddell ressaltou a importância desse "fator pessoal", que era "de conhecimento geral, mas não no grau manifesto. Verificou-se, com surpresa, que o bom inoculador pode perder o dom, e que aparentemente esse caso de mudança do local escolhido para a inoculação poderá resultar na manifestação de mais alto teor de vírus" ("Relatório anual do Laboratório de Transmissão da Seção de Febre Amarela").

Segundo a técnica padrão descrita em 1942, usava-se uma seringa tipo tuberculina com agulha de meia polegada e calibre 25. Enrolava-se arame fino de cobre na agulha, até exatamente 2 mm da ponta, para assegurar profundidade uniforme de inoculação. Com uma das mãos, o operador segurava o camundongo previamente anestesiado com éter; a seringa, na outra mão, perfurava o crânio perpendicularmente, num ponto situado precisamente a 2mm da linha mediana e 3mm para trás do olho. O volume inoculado era sempre 0,03 c.c.,

"cuidadosamente medidos". Num cartão, era registrada a evolução do estado do camundongo, desde a paralisia até a morte por encefalite, que em geral ocorria 21 dias após a inoculação.[22]



Inoculação intracerebral em camundongos. Cada amostra de vírus é injetada em seis camundongos. Nas três semanas seguintes à inoculação, os camundongos adoecem, tornam-se paralíticos e morrem dependendo da virulência do produto injetado. Rio de Janeiro, RJ, década de 1940.
Filme Preparação da vacina de febre amarela/Cinemateca Brasileira

"O título duma vacina é a recíproca da diluição que mataria 50% dos camundongos inoculados", segundo o método estatístico de Reed e Muench (1938, pp. 493-7). Como se calculava a dose letal para esses 50% dos camundongos? Suponhamos que estivesse entre um para cem e um para mil. Suponhamos, então, que fosse um para quinhentos. Assim, dividindo-se o concentrado viral em quinhentas partes de diluente, morriam 50% dos camundongos, o que significava dizer que aquela quantidade de concentrado continha quinhentas doses. Mas o cálculo não terminava aí, pois o volume inoculado em cada camundongo era sempre 0,03 c.c.

Para chegar-se ao título da vacina para uso humano, era preciso multiplicar o título baseado nesse volume por um fator matemático, que dava o número de DML — *letal doses for mouse*, ou doses letais para o camundongo — por centímetro cúbico de vacina. E se multiplicava pelo fator 16,6 para calcular-se o número de DML por tubo com capacidade para 0,5 cc de vacina dessecada. Posteriormente, passou-se a usar a sigla LD_{50} — que significa doses letais para 50% dos camundongos.

Segundo os padrões internacionais estabelecidos em 1944 para a fabricação e controle da vacina contra a febre amarela,[23] a quantidade mínima de vírus ativo para a imunização satisfatória do homem era de 500 LD_{50} — depois passaria a ser 1.000 LD_{50}. No laboratório do Rio de Janeiro, adotou-se como dose mínima aquela que continha 1.000 LD_{50}, quando se usavam vacinas com diluição de 1:100. Empregavam-se apenas duas diluições em campo 1:100 ou 1:50, que reduzia à metade o número de doses no tubo (de duzentas para cem), para compensar eventual queda na concentração de vírus vivos em conseqüência de exposição excessiva à temperatura ambiente. Se o título não permitisse que um lote fosse usado nessa diluição, ele era considerado impróprio para uso em campo. As concentrações de vírus obtidas pelos métodos usados no laboratório eram no entanto muito superiores.[24] Segundo tabela apresentada por Penna, na descrição de 1956 (p. 87), vinte lotes "típicos" de vacina preparados no Instituto Oswaldo Cruz davam, em média, títulos de 1:232,000 e 1:126,000, antes e depois da dessecação, que reduzia quase à metade a potência da vacina.

A decisão de manter elevada a titulação da vacina tinha relação com os danos que os vírus sofriam durante o tempo de armazenagem, com os freqüentes desarranjos do sistema de refrigeração, e especialmente com as dificuldades de transporte e a ausência de uma cadeia de frio para sustentar a titulação até as longínquas regiões interioranas onde grassava a febre amarela silvestre.

Em dezembro de 1949, por exemplo, Penna registrava:

> Desde algum tempo vem se notando que a imunidade produzida pelo vírus 17DD era tão baixa que na maioria dos casos não podia ser revelada pela prova de proteção em uso corrente no laboratório em amostras colhidas trinta dias após a vacinação. Aventada a hipótese de que o máximo título de anticorpos não era atingido dentro desse prazo, resolveu-se fazer a experiência de campo em que as amostras eram colhidas antes da vacinação, trinta e noventa dias após a vacinação. De fato, a porcentagem de positivos noventa dias após a vacinação é muito superior à de trinta dias. Entretanto, seria de desejar obter títulos mais altos nos soros pós-vacinação. Tentativas visando essa finalidade serão feitas nos próximos anos ("Resumo das atividades do laboratório" em 1949).

As adversidades enfrentadas pelo vírus vivo até o momento de ser inoculado, e o risco constante de perda de potência da vacina eram, em certa medida, neutralizados pela elevada titulação dos lotes recém-fabricados; também, pelo esforço de se obter a máxima dessecação da vacina, e de se concentrá-la de maneira que duzentas ou, no mínimo, cem pessoas pudessem ser vacinadas com o conteúdo de uma única ampola.

Lotes de vacina com a mais alta titulação e a menor percentagem de umidade residual eram escolhidos quando se tinha de alcançar lugares de difícil acesso, como, por exemplo, igarapés da Amazônia, só acessíveis por canoa. Nessas condições, a vacina podia permanecer sem refrigeração por até 15 dias, sendo diluída a 1:50. Para as remessas a países estrangeiros, selecionavam-se, também, lotes com alto título, fixando-se a validade por um período de seis meses, desde que a vacina fosse mantida à temperatura de 5ºC ou menos (Penna, 1956, p.88).

Origem dos dados sobre a produção da vacina contra febre amarela

As tabelas e gráficos exibidos nos capítulos três e quatro, e muitas afirmações feitas no texto baseiam-se em dados contidos em 14 fichários pertencentes ao acervo do Laboratório de Vacina Contra a Febre Amarela (LAFA), localizado no Pavilhão Henrique de Beaurepaire Rohan Aragão, um dos prédios do complexo Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Os fichários contêm principalmente relatórios mensais e anuais de atividades do laboratório, com dados sobre a manufatura da vacina em 1943-45, quando o laboratório pertencia ainda à Fundação Rockefeller; 1946-49, quando esteve subordinado ao Serviço Nacional de Febre Amarela; e 1950-82, quando passou a Instituto Oswaldo Cruz, depois Fundação Instituto Oswaldo Cruz e, por fim, Fundação Oswaldo Cruz.

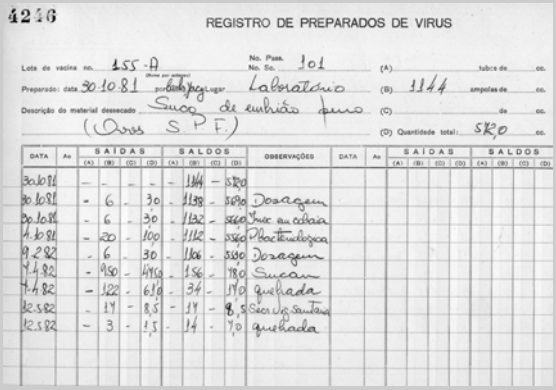
Os relatórios mensais e anuais (para 1943, só há relatório anual) apresentam informações quantitativas sobre os lotes produzidos e respectivas diluições para envase, demanda e estoque de vacina; doses utilizadas no próprio laboratório em testes bacteriológicos, de potência, proteção etc. Encontram-se, também, informações qualitativas sobre fatos técnicos ou administrativos relacionados à preparação da vacina, como melhorias tecnológicas, planejamento para o exercício seguinte, licenças e férias de funcionários, exportação de vacinas, convênios com órgãos nacionais e internacionais de saúde etc.

Depois da transferência do laboratório para o Instituto Oswaldo Cruz (1950), observa-se acentuado declínio da riqueza em informações desses relatórios, especialmente no tocante ao aprimoramento tecnológico da vacina. O fato de serem produzidos para figurar no relatório anual da Divisão de Vírus do IOC, ao qual o LAFA ficou subordinado, explica, apenas em parte, esse empobrecimento. Os volumes referentes às décadas de 1960 e 1970 contêm, assim, alguns relatórios anuais de outros laboratórios da Divisão de Vírus: Cultura de Tecidos e Enterovírus (1967 e 1968); Histopatologia (1969); Vírus e Tumores (1967); Vacina Antigripe (1968-69) e Vacina Antivariólica (1968-69/ 1970).

No momento em que iniciamos a consulta ao acervo do LAFA, ele se encontrava depositado, sem nenhuma ordenação, numa sala que entrou em obras. Para viabilizar a recuperação dos dados referidos no presente trabalho, criamos uma ordenação sumária e provisória:

Vol. I [1943-1953] — Produção Antiamarílica
Vol. II [1954-1967] — Produção Antiamarílica
Vol. III [1968-1969] — Produção Antiamarílica
Vol. IV [1970-1973] — Produção Antiamarílica
Vol. V [1974-1976] —Produção Antiamarílica
Vol. VI [1977-1982] — Produção Antiamarílica
Vol. VII [Déc. 80-90] — Produção Antiamarílica
Vol. VIII [Déc. 60] — Seção de Vírus
Vol. IX [Déc. 60] — Seção de Vírus
Vol. X [1965-1968] — Correspondência
Vol. XI [1970] — Produção Antiamarílica e Antivariólica
LAFA 04 [1943-1964]— Produção Antiamarílica
LAFA 05 [1943-1964] — Seção de Vírus
LAFA 06 [1968-1969] — Seção da Produção

As informações quantitativas contidas nesses volumes são estruturadas segundo três padrões diferentes, que refletem, por um lado, as condutas político-administrativas específicas a cada período; por outro, mudanças na manufatura da vacina devidas a inovações tecnológicas ou à adequação às determinações da Organização Mundial de Saúde.



4216

REGISTRO DE PREPARADOS DE VIRUS

Lote de vacina no. 155-A — No. Pass. No. Sc. 101

Preparado: data 30-10-81 — por [illegible] — Laboratório

Descrição do material dessecado Suco de cultura puro (Doss S P F.)

(A) ____ tubos de ____ cc.
(B) 1144 ampolas de ____ cc.
(C) ____ de ____ cc.
(D) Quantidade total: 5720 cc.

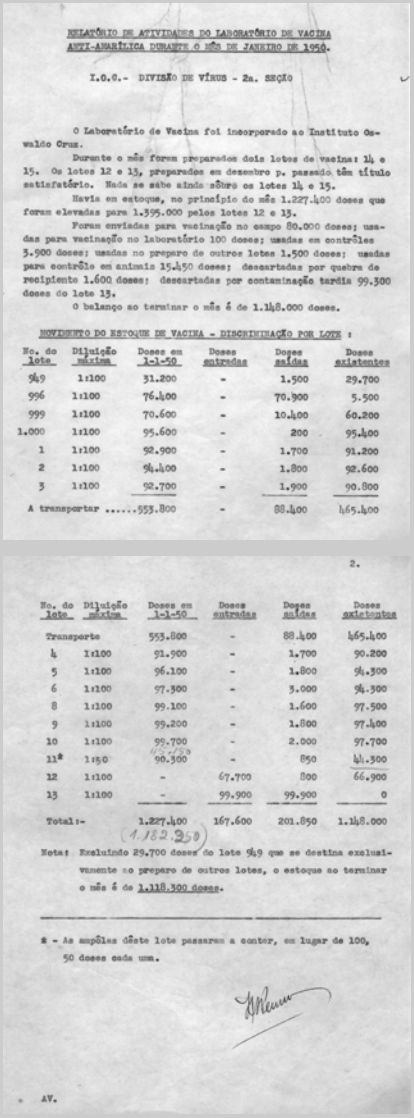
DATA	Ao	SAÍDAS (A)	SAÍDAS (B)	SAÍDAS (C)	SAÍDAS (D)	SALDOS (A)	SALDOS (B)	SALDOS (C)	SALDOS (D)	OBSERVAÇÕES
30/10/81		–	–	–	–	–	1144	–	5720	
30/10/81		–	6	–	30	–	1138	–	5690	Dosagem
30/10/81		–	6	–	30	–	1132	–	5660	Inoc. em coelho
4/11/81		–	20	–	100	–	1112	–	5560	Bacteriológica
9/2/82		–	6	–	30	–	1106	–	5530	Dosagem
4/4/82		–	950	–	4750	–	156	–	780	Sucam
4/4/82		–	122	–	610	–	34	–	170	quebrada
12/5/82		–	17	–	8,5	–	17	–	8,5	Sec. Vig. Sanitária
12/5/82		–	3	–	1,5	–	14	–	7,0	quebrada

Registro de preparado de vírus 4201-4400, dolote 110-A ao 187-A, 17/08/1978 a 08/10/1982. LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Os dados quantitativos apresentados nos relatórios mensais e anuais do período 1943-82 baseiam-se numa série documental intitulada "Registro de preparado de vírus", perfazendo 46 volumes que abarcam o período de 1936 a 1982. Eles guardam as 'certidões de nascimento' dos lotes semente e vacina criados no laboratório. As páginas numeradas destes registros trazem, no cabeçalho, o número do lote, o lote do qual se originou, a data de preparação, os nomes dos técnicos e/ou médicos responsáveis pelo serviço, a quantidade correspondente de ampolas e de centímetros cúbicos de vacina. As colunas da página descrevem o percurso do lote até sua extinção, indicando as sucessivas saídas de partes dele, sob a forma de ampolas e de volume em centímetros cúbicos. Uma coluna traz observações sobre o destino de cada saída (dosagem, quebra, prova bacteriológica, vacinação etc.).

As tabelas e gráficos apresentados neste capítulo e no capítulo quatro foram preparados a partir dos dados contidos nos relatórios mensais e anuais que se encontram em 14 fichários. O primeiro padrão de estruturação dos dados vigorou no período 1944 a 1970. Cada relatório mensal relaciona lotes que acabam de ser produzidos e lotes produzidos anteriormente, considerados parte do estoque existente no começo do mês. Cada linha do documento consigna a saída de doses para uso interno e externo, provenientes de lotes novos ou antigos, indicando a diluição máxima recomendada para a vacinação e, por último, o resíduo de cada lote, que configurará, no relatório do mês seguinte, o estoque disponível.

Um relatório mensal, de duas ou três páginas, compreende, em geral, três partes: o cabeçalho define a temporalidade do documento; em seguida, o chefe do laboratório ou um seus auxiliares narra os fatos extraodinários ou rotineiros ocorridos durante o mês; e por fim, descreve, num quadro numérico, o movimento mensal do laboratório, discriminando o estoque, as doses de vacina existentes do começo do mês; a saída de doses para "vacinação" ou "outros usos"; a entrada, que são as doses produzidas naquele mês, "em valores aproximados" e, por último, o existente, que é a soma de "estoque' e "entrada" menos a "saída", distinguindo-se, porém, "estoque real" e certa quantidade de doses (de lotes semente secundários) que serão usadas para preparar outros lotes de vacina. Este valor é demarcado no "existente", mas não é subtraído dele. O existente no final de um mês é o estoque no começo do mês seguinte.



RELATÓRIO DE ATIVIDADES DO LABORATÓRIO DE VACINA ANTI-AMARÍLICA DURANTE O MÊS DE JANEIRO DE 1950.

I.O.C.- DIVISÃO DE VÍRUS - 2a. SEÇÃO

O Laboratório de Vacina foi incorporado ao Instituto Oswaldo Cruz.

Durante o mês foram preparados dois lotes de vacina: 14 e 15. Os lotes 12 e 13, preparados em dezembro p. passado têm título satisfatório. Nada se sabe ainda sôbre os lotes 14 e 15.

Havia em estoque, no princípio do mês 1.227.400 doses que foram elevadas para 1.395.000 pelos lotes 12 e 13.

Foram enviadas para vacinação no campo 80.000 doses; usadas para vacinação no laboratório 100 doses; usadas em contrôles 3.900 doses; usadas no preparo de outros lotes 1.500 doses; usadas para contrôle em animais 15.450 doses; descartadas por quebra de recipiente 1.600 doses; descartadas por contaminação tardia 99.300 doses do lote 13.

O balanço ao terminar o mês é de 1.148.000 doses.

MOVIMENTO DO ESTOQUE DE VACINA - DISCRIMINAÇÃO POR LOTE :

No. do lote	Diluição máxima	Doses em 1-1-50	Doses entradas	Doses saídas	Doses existentes
949	1:100	31.200	-	1.500	29.700
996	1:100	76.400	-	70.900	5.500
999	1:100	70.600	-	10.400	60.200
1.000	1:100	95.600	-	200	95.400
1	1:100	92.900	-	1.700	91.200
2	1:100	94.400	-	1.800	92.600
3	1:100	92.700	-	1.900	90.800
A transportar		553.800	-	88.400	465.400

2.

No. do lote	Diluição máxima	Doses em 1-1-50	Doses entradas	Doses saídas	Doses existentes
Transporte		553.800	-	88.400	465.400
4	1:100	91.900	-	1.700	90.200
5	1:100	96.100	-	1.800	94.300
6	1:100	97.300	-	3.000	94.300
8	1:100	99.100	-	1.600	97.500
9	1:100	99.200	-	1.800	97.400
10	1:100	99.700	-	2.000	97.700
11*	1:50	90.300	-	850	41.300
12	1:100	-	67.700	800	66.900
13	1:100	-	99.900	99.900	0
Total:-		1.227.400	167.600	201.850	1.148.000

1.183.250

Nota: Excluindo 29.700 doses do lote 949 que se destina exclusivamente ao preparo de outros lotes, o estoque ao terminar o mês é de 1.118.300 doses.

* - As ampôlas dêste lote passaram a conter, em lugar de 100, 50 doses cada uma.

AV.

Relatório mensal de atividades, janeiro de 1950.
LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

As doses que “saem” destinam-se à “vacinação” e a “outros usos”. Os relatórios anuais definem, na parte textual, qual proporção de doses foi enviada a órgãos públicos brasileiros — principalmente o Ministério da Saúde — e os relatórios mensais, quantas foram exportadas para outros países.

Os “outros usos” da categoria saída compreendem, nos relatórios mensais, diversas subcategorias. Em laboratório de vacina consignam-se doses inoculadas em pessoas que vêm se vacinar no próprio LAFA. Controle designa doses usadas em testes bacteriológicos, de qualidade, titulação, termoestabilidade etc. Outros itens designam saídas similares: prova (prova bacteriológica); verificação (de água residual ou da qualidade da dessecação) e estudos (doses reservadas para investigações no próprio LAFA ou em outros laboratórios). As maiores saídas para “outros usos” que não as vacinações se devem a contaminação (doses correspondentes em geral a lotes inteiros contaminados por microrganismos); descarte (por quebra de tubos e/ou ampolas ou por título baixo decorrente de falha de produção); e título, que designa queda do título durante a prolongada armazenagem da vacina, em virtude de variações térmicas, panes nos sistemas elétricos de refrigeração e outros fatores, o que em geral acarretava a necessidade de diminuir a diluição da vacina e, conseqüentemente, o número de doses derivadas do lote comprometido. Sob “diversos” enumeravam-se retiradas para consumos eventuais (cientistas e clínicos, outras instituições etc.).

No período de 1971 a 1977, isto é, a partir da criação da Fundação Instituto Oswaldo Cruz até a gestão de Vinícius da Fonseca, os dados são estruturados segundo novo padrão, no qual se observa maior preocupação com o controle dos lotes no início, meio e fim de cada mês.

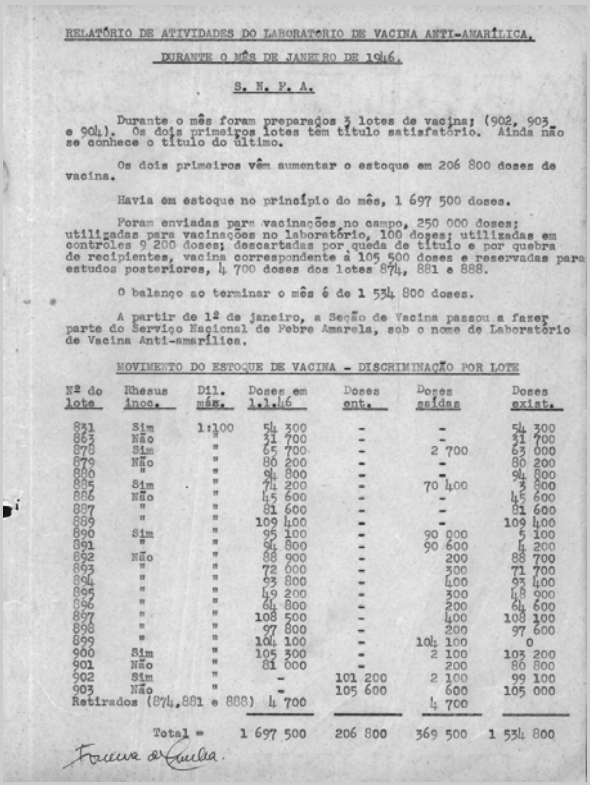
No segmento Início do Mês são apresentados os itens disponíveis— doses existentes no estoque do mês anterior — e controle, que indica as que dependem de provas de inocuidade e atividade. Quando liberadas, estas doses integram o item “disponível” no Final do Mês ou no Início do Mês seguinte.

No segundo segmento, Movimento do Mês, são registradas as entradas —doses preparadas durante o mês, que dependem de testes de controle para liberação — e saídas, que reúnem as doses destinadas a vacinação ou descartadas por insuficiência de título, contaminação ou reprovação em outros testes.

No último segmento, Final do Mês, constam os itens disponível (doses aprovadas pelo controle) e controle (doses ainda não aprovadas). No mês de dezembro, este item apresenta o total de doses em estoque no ano que ali se encerra.

A partir dos fatos narrados nos relatórios mensais de atividades e dos dados referidos no item saídas, no Movimento do Mês, obtém-se o número de doses mensais destinadas a vacinação, geralmente maior do que a quantidade anual de doses entregues ao Ministério da Saúde e outros órgãos públicos, ou exportadas para outros países. Estes últimos valores encontram-se nos relatórios anuais de atividades ou ainda no "Resumo anual de atividades" do Laboratório de Vacina Antiamarílica, da Divisão de Virologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, documentos de cunho oficial mais sintéticos, atentos sobretudo a compromissos decorrentes de convênios envolvendo a fundação, o Ministério da Saúde e agências internacionais como a OPAS.

No terceiro padrão de estruturação dos dados, correspondente ao período de 1978 a 1982, aparecem não apenas os valores da produção mensal e dos controles dos lotes manufaturados, mas também aqueles relativos a etapas intermediárias do processo de produção: ovos recebidos e inoculados, número de embriões coletados e volume de polpa obtido, em mililitros. A mudança reflete a adoção de novos insumos (ovos SPF, por exemplo) e novas técnicas; a adequação às normas cada vez mais rigorosas da Organização Mundial de Saúde e às novas rotinas administrativas que regem o Laboratório de Produção de Vacina contra a Febre Amarela da Coordenadoria de Produção de Vacinas Virais da recém-criada Superintendência de Bio-Manguinhos.



RELATÓRIO DE ATIVIDADES DO LABORATÓRIO DE VACINA ANTI-AMARÍLICA,

DURANTE O MÊS DE JANEIRO DE 1946.

S. N. F. A.

Durante o mês foram preparados 3 lotes de vacina; (902, 903 e 904). Os dois primeiros lotes têm título satisfatório. Ainda não se conhece o título do último.

Os dois primeiros vêm aumentar o estoque em 206 800 doses de vacina.

Havia em estoque no princípio do mês, 1 697 500 doses.

Foram enviadas para vacinações no campo, 250 000 doses; utilizadas para vacinações no laboratório, 100 doses; utilizadas em contrôles 9 200 doses; descartadas por queda de título e por quebra de recipientes, vacina correspondente à 105 500 doses e reservadas para estudos posteriores, 4 700 doses dos lotes 874, 881 e 888.

O balanço ao terminar o mês é de 1 534 800 doses.

A partir de 1º de janeiro, a Seção de Vacina passou a fazer parte do Serviço Nacional de Febre Amarela, sob o nome de Laboratório de Vacina Anti-amarílica.

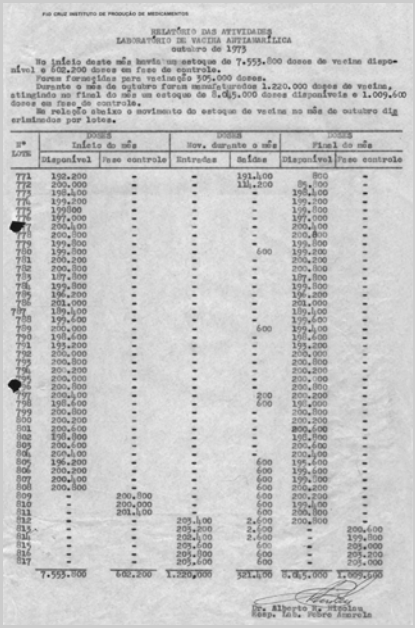
MOVIMENTO DO ESTOQUE DE VACINA - DISCRIMINAÇÃO POR LOTE

Nº do lote	Rhesus inoc.	Dil. mês.	Doses em 1.1.46	Doses ent.	Doses saídas	Doses exist.
871	Sim	1:100	54 300	-	-	54 300
863	Não	"	31 700	-	-	31 700
878	Sim	"	65 700	-	2 700	63 000
879	Não	"	86 200	-	-	86 200
880	"	"	94 800	-	-	94 800
885	Sim	"	74 200	-	70 400	3 800
886	Não	"	45 600	-	-	45 600
887	"	"	81 600	-	-	81 600
889	"	"	109 400	-	-	109 400
890	Sim	"	95 100	-	90 000	5 100
891	"	"	94 800	-	90 600	4 200
892	Não	"	88 900	-	200	88 700
893	"	"	72 000	-	300	71 700
894	"	"	93 800	-	400	93 400
895	"	"	49 200	-	300	48 900
896	"	"	64 800	-	200	64 600
897	"	"	108 500	-	400	108 100
898	"	"	97 800	-	200	97 600
899	"	"	104 100	-	104 100	0
900	Sim	"	105 300	-	2 100	103 200
901	Não	"	81 000	-	200	80 800
902	Sim	"	-	101 200	2 100	99 100
903	Não	"	-	105 600	600	105 000
Retirados (874, 881 e 888)			4 700		4 700	
Total =			1 697 500	206 800	369 500	1 534 800

Fonseca d'Eca

Relatório mensal de atividades, janeiro de 1946.
LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

As tabelas apresentadas nos relatórios mensais do período contêm os itens lote (número de lotes preparados, quantificando-se a apresentação da vacina em 200 e 50 doses por ampola); entrada (doses produzidas), saldo anterior (estoque do mês anterior), saída (doses destinadas a testes e a vacinação), saldo atual (doses em estoque no final do mês) e disponível (estoque real, obtido pela subtração das doses sob controle do "saldo atual").



FIO CRUZ INSTITUTO DE PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS

RELATÓRIO DAS ATIVIDADES
LABORATÓRIO DE VACINA ANTIAMARÍLICA
outubro de 1973

No início deste mês havia um estoque de 7.953.800 doses de vacina disponível e 602.200 doses em fase de controle.
Foram formuladas para vacinação 305.000 doses.
Durante o mês de outubro foram manufaturadas 1.220.000 doses de vacina, atingindo no final do mês um estoque de 8.845.000 doses disponíveis e 1.009.600 doses em fase de controle.
Na relação abaixo o movimento do estoque de vacina no mês de outubro discriminados por lotes.

Nº LOTE	DOSES Início do mês		DOSES Nov. durante o mês		DOSES Final do mês	
	Disponível	Fase controle	Entradas	Saídas	Disponível	Fase controle
771	192.200	-	-	191.400	800	-
772	200.000	-	-	111.200	88.800	-
773	198.400	-	-	-	198.400	-
774	199.200	-	-	-	199.200	-
775	199800	-	-	-	199.800	-
776	197.000	-	-	-	197.000	-
777	200.400	-	-	-	200.400	-
778	200.800	-	-	-	200.800	-
779	199.800	-	-	-	199.800	-
780	199.800	-	-	600	199.200	-
781	200.200	-	-	-	200.200	-
782	200.800	-	-	-	200.800	-
783	107.800	-	-	-	107.800	-
784	199.800	-	-	-	199.800	-
785	196.200	-	-	-	196.200	-
786	201.000	-	-	-	201.000	-
787	139.400	-	-	-	139.400	-
788	199.600	-	-	-	199.600	-
789	200.000	-	-	600	199.400	-
790	198.600	-	-	-	198.600	-
791	193.200	-	-	-	193.200	-
792	200.000	-	-	-	200.000	-
793	200.800	-	-	-	200.800	-
794	200.200	-	-	-	200.200	-
795	200.800	-	-	-	200.800	-
796	200.800	-	-	-	200.800	-
797	200.400	-	-	200	200.200	-
798	198.600	-	-	600	198.000	-
799	200.800	-	-	-	200.800	-
800	200.200	-	-	-	200.200	-
801	200.600	-	-	-	200.600	-
802	198.800	-	-	-	198.800	-
803	200.600	-	-	-	200.600	-
804	200.400	-	-	-	200.400	-
805	196.200	-	-	600	195.600	-
806	200.200	-	-	600	199.600	-
807	200.400	-	-	600	199.800	-
808	200.800	-	-	600	200.200	-
809	-	200.800	-	600	200.200	-
810	-	200.800	-	600	199.800	-
811	-	201.400	-	600	200.800	-
812	-	-	205.400	2.600	200.800	-
813	-	-	205.200	2.600	-	200.600
814	-	-	202.400	2.600	-	199.800
815	-	-	205.600	600	-	205.000
816	-	-	205.800	600	-	205.200
817	-	-	205.600	600	-	205.000
	7.953.800	602.200	1.220.000	321.400	8.845.000	1.009.600

Dr. Alberto Xavier Machado
Resp. Lab. Febre Amarela

Relatório mensal de atividades outubro de 1973.
LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

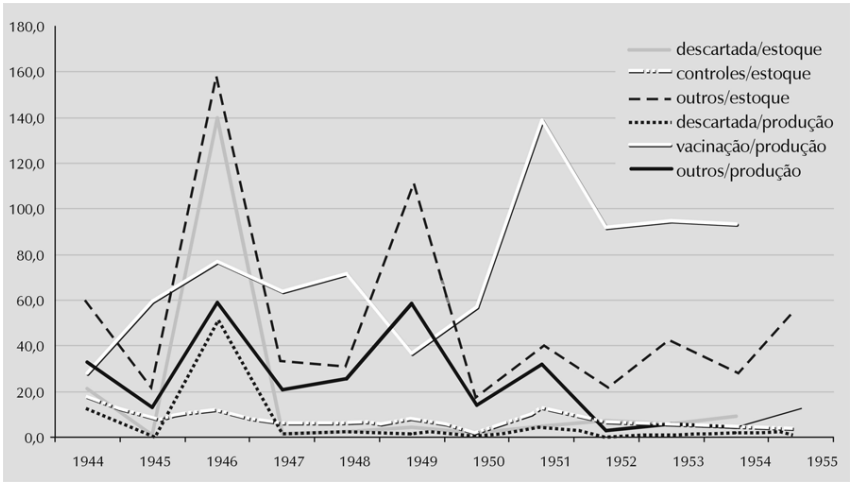
O sistema de informações do período inclui o "Relatório de controles realizados", preparado pelo Laboratório de Controle de Vacinas de Bio-Manguinhos, que assume a execução das provas bacteriológicas e dos testes de esterilidade. Os relatórios mensais não especificam mais a quantidade de doses destinadas a vacinação. Esta informação encontra-se apenas nos relatórios anuais de atividades.

No período de 1983 a 1999, as modificações técnicas e arquitetônicas realizadas no laboratório, que analisaremos no capítulo quatro, tornam mais automatizado e segmentado o processo de produção da vacina e também o de produção de informações. As atividades de envase e liofilização, rotulagem e embalagem, estocagem e distribuição, que eram executadas nos mesmos pavilhões onde se dava a preparação da vacina, são transferidas para outros prédios e ficam a cargo de outras equipes. Isso se traduz em desagregação dos dados, que passam a figurar em protocolos específicos. No tempo de vigência dos três primeiros padrões, os relatórios eram confeccionados por médicos que tinham total controle sobre as diversas etapas da produção, sobre os trabalhos laboratoriais conexos e as experimentações que redundavam em constantes aperfeiçoamentos tecnológicos. A partir de 1983, os documentos fornecem resumos parciais das atividades desenvolvidas em diferentes setores e, apesar das facilidades proporcionadas pela informatização, observa-se a ausência de um sistema eficiente de agregação destas informações.

Os dados relativos ao período 1983-99 provieram do documento intitulado "Série histórica de Bio-Manguinhos" (mimeo, s.d., 4 fl.). Referem-se às quantidades de doses "produzidas" pelo Laboratório de Vacina Contra a Febre Amarela e "entregues" ao Ministério da Saúde, para atender aos programas nacionais de imunização.

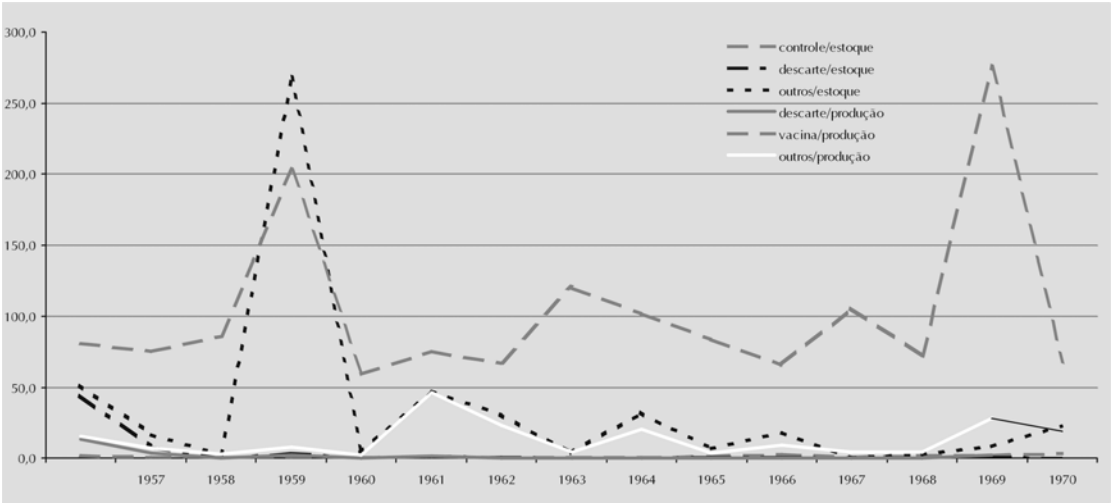
As tabelas que produzimos a partir destas fontes reduzem as várias categorias utilizadas pelos sucessivos padrões descritos acima à estrutura básica que é seu denominador comum: entradas (vacinas produzidas a cada mês); saídas (para vacinação e outros usos) e estoque, que é a diferença entre estes dois movimentos.

Comportamento da razão entre as principais variáveis no processo de preparação de vacina (febre amarela) - 1944 a 1955



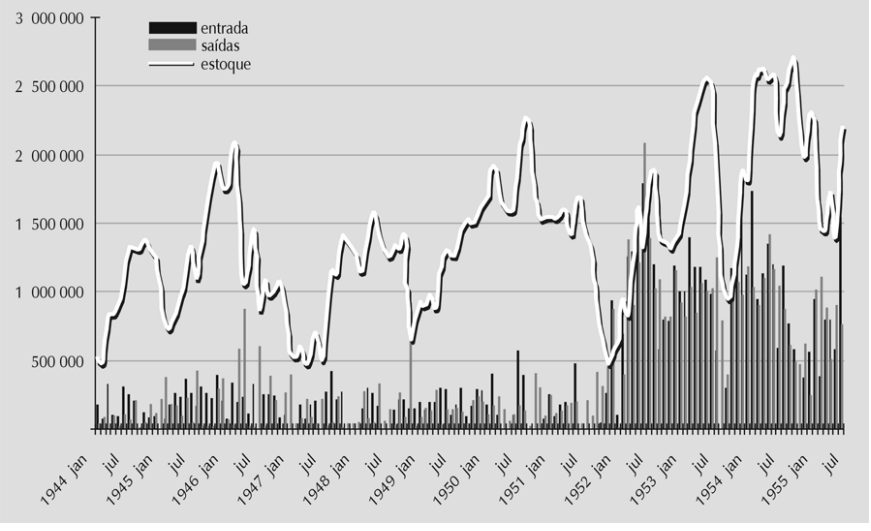
Fonte: Relatórios mensais de atividades - LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Comportamento da razão entre as principais variáveis no processo de preparação de vacina (febre amarela) - 1956 a 1970



Fonte: Relatórios mensais de atividades - LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Vacina anti-amarílica, estoque e fluxo de entrada e saída de doses - jan/1944 a dez/1955



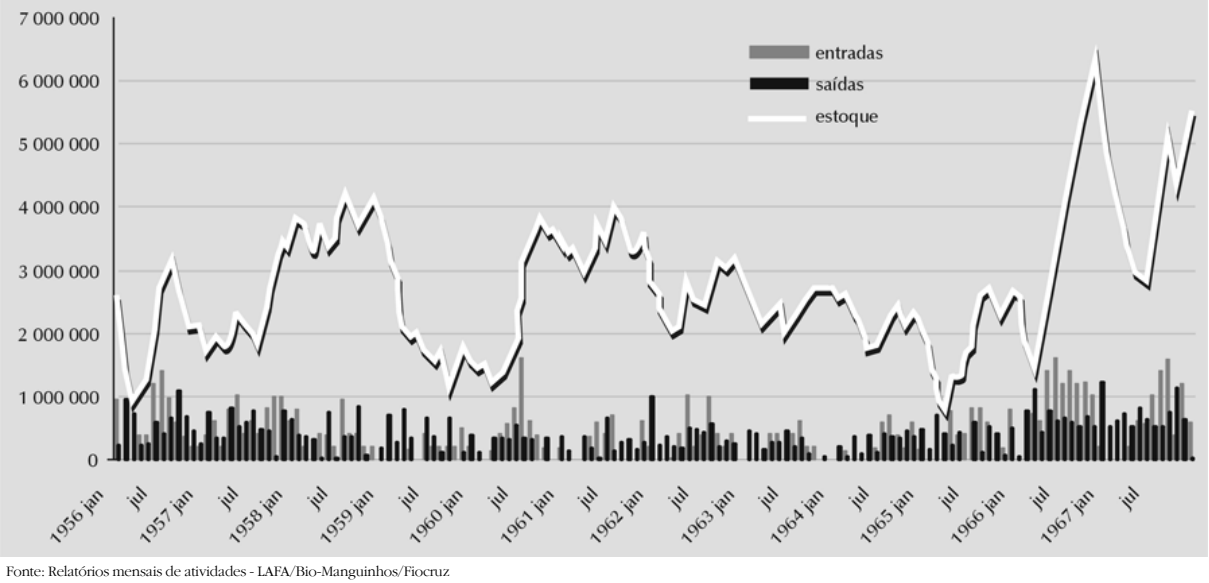
Fonte: Relatórios mensais de atividades - LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Vacina anti-amarílica, entradas, saídas e estoques - janeiro/1944 a dezembro/1955

		janeiro	fevereiro	março	abril	maio	junho	julho	agosto	setembro	outubro	novembro	dezembro
1944	entradas	176 200	79 000	323 800	107 400	90 900	308 400	256 800	208 100		122 500	80 900	89 600
	saídas	36 500	84 200	50 800	91 500	15 900	99 000	67 700	210 800	6 400	47 600	177 000	111 800
	estoque	534 400	529 200	802 200	818 100	782 900	992 300	1 181 400	1 178 700	1 050 600	1 125 500	1 029 400	1 007 200
1945	entradas		76 500	179 650	263 700	230 200	366 800	264 100	172 500	309 700	258 400	225 600	394 700
	saídas	218 300	378 700	174 500	170 950	91 100	227 700	49 200	418 400	22 700	18 000	20 500	291 800
	estoque	819 200	517 000	522 150	614 900	754 000	893 100	1 108 000	862 100	1 149 100	1 389 500	1 594 600	1 697 500
1946	entradas	206 800	77 900	341 700	193 400	230 200	108 500	325 700	600	250 000	256 400	244 300	88 800
	saídas	369 500	68 900	28 900	578 700	874 900	16 900	10 000	597 100	16 200	382 900	205 900	3 200
	estoque	1 534 800	1 543 800	1 856 600	1 471 300	826 600	918 200	1 233 900	637 400	871 200	744 700	783 100	868 700
1947	entradas	107 800			178 300	70 900	175 300	203 000		276 500	424 800	219 100	275 600
	saídas	266 600	391 900	33 720	74 720	219 940	80 440	41 800	213 460	17 800	46 100	236 700	6 300
	estoque	709 900	280 100	246 380	349 960	200 920	295 780	456 980	243 520	502 220	880 920	863 320	1 132 620
1948	entradas	275 600				149 600	297 600	264 300	173 300			136 800	212 600
	saídas	6 300	41 200	33 000	51 400	276 200	73 800	46 000	329 600	56 700	138 000	29 500	258 000
	estoque	1 132 620	1 115 000	1 082 000	1 030 600	904 000	1 127 800	1 346 100	1 189 800	1 164 700	1 026 700	1 134 000	1 088 600
1949	entradas	148 600	154 200	199 600	144 000	199 000	197 900	295 600	294 800	99 600	175 000	300 400	91 500
	saídas	922 800	23 400	80 300	146 400	133 900	282 000	26 500	143 100	142 100	148 500	119 200	34 700
	estoque	447 400	578 200	697 500	- 2 400	62 700	- 21 400	247 700	399 400	356 900	383 400	564 600	621 400
1950	entradas	167 600	286 800	280 100	177 800	398 800	100 600			99 600	572 300	394 700	
	saídas	201 850	231 000	196 100	102 800	170 600	234 400	144 500	57 350	101 750	167 750	130 750	15 100
	estoque	587 150	1 203 800	1 287 800	1 362 800	1 591 000	1 457 200	1 312 700	1 255 350	1 253 200	1 657 750	1 921 700	1 906 600
1951	entradas			75 600	255 100	96 000	176 700	197 100		474 400			
	Saídas	400 800	296 400	92 000	246 700	114 300	132 400	170 600	187 400	198 400	40 000	208 900	90 600
	estoque	1 505 800	1 209 400	1 193 000	1 201 400	1 183 100	1 227 400	1 253 900	1 066 500	1 342 500	1 302 500	1 093 600	1 003 000
1952	entradas		48 750	266 500	935 400	99 700	696 900	1 257 900	1 290 400	1 611 400	1 789 600	1 781 000	1 195 400
	saídas	414 400	305 600	452 750	870 300	6 400	397 900	1 382 300	903 300	1 206 000	2 080 000	1 383 000	1 026 000
	estoque	588 600	331 750	145 500	210 600	303 900	602 900	478 500	865 600	1 271 000	980 600	1 378 600	1 548 000
1953	entradas	584 800	794 200	783 400	1 195 000	1 003 400	1 004 200	1 398 800	1 184 400	1 182 200	1 084 700	987 400	569 600
	saídas	1 092 000	816 600	820 000	1 153 800	914 800	819 400	1 027 200	848 200	1 063 600	1 000 400	1 020 200	1 245 500
	estoque	1 040 800	1 018 400	981 800	1 023 000	1 111 600	1 296 400	1 668 000	2 004 200	2 122 800	2 207 100	2 174 300	1 498 400
1954	entradas		298 800	1 167 800	1 382 200	1 541 800	1 121 800	1 730 800	950 400	1 135 800	1 346 400	1 197 000	591 200
	saídas	788 400	398 000	1 111 800	1 069 800	978 200	1 178 600	1 034 000	897 400	1 098 800	1 416 600	1 166 000	1 042 000
	estoque	710 000	610 800	666 800	979 200	1 542 800	1 486 000	2 182 800	2 235 800	2 272 800	2 202 600	2 233 600	1 782 800
1955	entradas	1 189 600	771 600	582 000		372 200	558 200	948 400	383 600	800 200	793 200	584 800	1 550 400
	saídas	871 200	612 400	485 200	468 400	615 200	239 400	1 014 000	1 107 600	883 800	509 600	902 800	759 200
	estoque	2 101 200	2 260 400	2 357 200	1 888 800	1 645 800	1 964 600	1 899 000	1 175 000	1 091 400	1 375 000	1 057 000	1 848 200

Fonte: Relatórios mensais de atividades - LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Vacina anti-amarílica, estoque e fluxo de entrada e saída - jan/1956 a dez/67



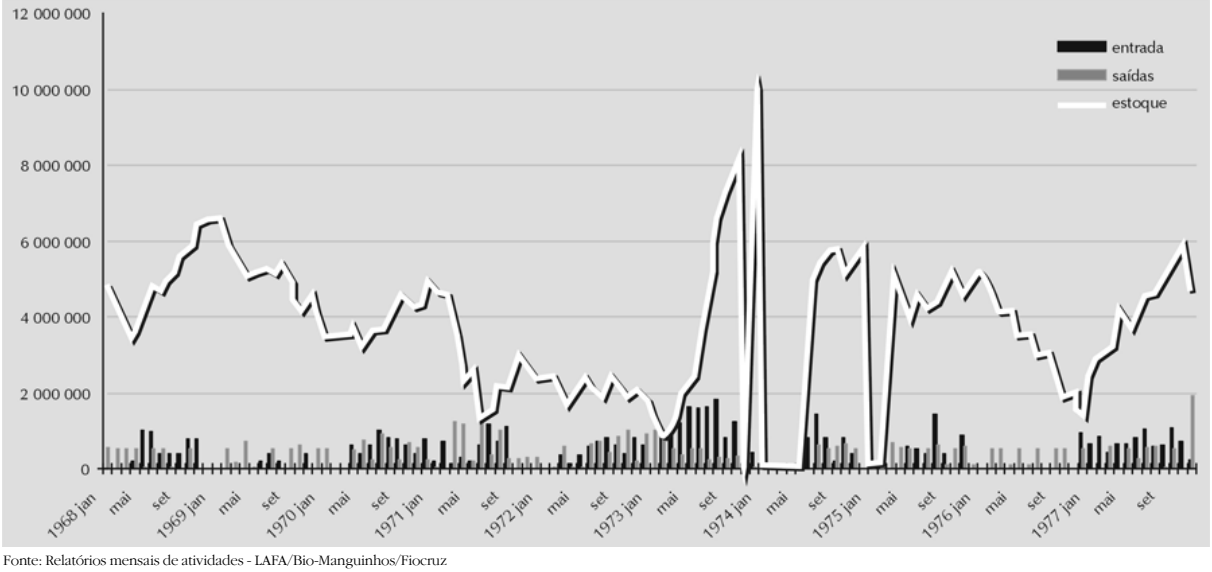
Fonte: Relatórios mensais de atividades - LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Vacinas anti-amarílicas, entradas, saídas e estoques - janeiro/1956 a dezembro/1967

		janeiro	fevereiro	março	abril	maio	junho	julho	agosto	setembro	outubro	novembro	dezembro
1956	entradas	959 000			381 000	395 600	1 193 600	1 394 000	985 000	596 400	370 600	201 800	197 600
	saídas	218 400	962 000	717 400	217 800	251 800	580 000	399 400	653 400	1 093 000	690 400	447 000	241 000
	Estoque	2 588 800	1 626 800	909 400	1 072 600	1 216 400	1 830 000	2 824 600	3 156 200	2 659 600	2 339 800	2 094 600	2 051 200
1957	entradas	387 800	601 000	201 200	800 000	1 013 200	405 200	608 000	400 800	809 200	1 003 000	1 006 800	605 000
	saídas	738 000	349 000	333 000	811 200	521 000	588 000	771 200	471 000	452 400	44 200	760 400	628 800
	estoque	1 701 000	1 953 000	1 821 200	1 810 000	2 302 200	2 119 400	1 956 200	1 886 000	2 242 800	3 201 600	3 448 000	3 424 200
1958	entradas	796 400	202 800		404 600	393 800	200 000	959 000	404 400	401 800	202 800	202 600	
	saídas	380 000	356 800	327 600	25 400	758 800	23 600	365 600	362 600	837 800	59 000	4 400	184 400
	Estoque	3 840 600	3 686 600	3 359 000	3 738 200	3 373 200	3 549 600	4 143 000	4 184 800	3 748 800	3 892 600	4 090 800	3 906 400
1959	entradas				161 600		410 400	203 000	201 800	203 000	202 600	503 600	202 600
	saídas	696 400	266 400	785 000	347 400	3 400	652 400	354 200	123 200	655 200	8 000	120 000	391 000
	estoque	3 210 000	2 943 600	2 158 600	1 972 800	1 969 400	1 727 400	1 576 200	1 654 800	1 202 600	1 397 200	1 780 800	1 592 400
1960	entradas	202 600			126 600	400 400	567 200	806 200	1 614 600	607 600	377 200	177 400	
	saídas	391 000	121 000	1 200	341 600	331 800	307 600	541 000	329 800	328 400	3 400	340 600	7 000
	estoque	1 592 400	1 471 400	1 470 200	1 255 200	1 323 800	1 583 400	1 848 600	3 133 400	3 412 600	3 786 400	3 623 200	3 616 200
1961	entradas				351 600	591 800	405 000	693 800				606 600	202 800
	saídas	129 000	1 600	361 000	182 400	18 400	648 200	128 600	279 600	308 200	151 600	265 200	996 400
	estoque	3 305 800	3 304 200	2 943 200	3 112 400	3 685 800	3 442 600	4 007 800	3 728 200	3 420 000	3 268 400	3 609 800	2 816 200
1962	entradas			32 000	405 600	1 014 600	201 200	392 000	1 001 000	405 600	201 200	404 800	
	saídas	221 200	366 200	211 400	180 800	490 000	475 800	427 400	562 200	200 200	295 900	250 600	
	estoque	2 595 000	2 228 800	2 049 400	2 274 200	2 798 800	2 524 200	2 488 800	2 927 600	3 133 000	3 038 300	3 192 500	3 192 500
1963	entradas				403 400	405 200		403 000	604 800	202 800	201 000		
	saídas	450 000	405 400	153 400	276 800	268 600	457 200	211 400	350 600	86 600	2 600	34 000	
	estoque	2 742 500	2 337 100	2 183 700	2 310 300	2 446 900	1 989 700	2 181 300	2 435 500	2 551 700	2 750 100	2 716 100	2 716 100
1964	entradas		146 000				183 000	598 100	707 800	386 800	174 800	578 000	161 400
	saídas	210 600	51 800	354 800	87 800	395 000	107 400	403 800	358 300	349 800	457 700	351 600	465 000
	estoque	2 505 500	2 599 700	2 244 900	2 157 100	1 762 100	1 837 700	2 032 000	2 381 500	2 418 500	2 135 600	2 362 000	2 058 400
1965	entradas				762 600	377 200	403 200	809 400	807 200	598 000		177 800	794 800
	saídas	158 800	711 600	411 800	225 800	428 800	9 400	585 000	114 200	520 400	412 200	73 000	487 600
	estoque	1 899 600	1 188 000	776 200	1 313 000	1 261 400	1 655 200	1 879 600	2 572 600	2 650 200	2 238 000	2 342 800	2 650 000
1966	entradas			727 600	604 800	1 402 400	1 619 200	1 199 200	1 395 000	1 211 400	1 214 600	1 009 400	201 600
	saídas	42 400	781 000	1 105 000	423 400	774 000	605 000	657 600	584 400	527 800	685 000	523 600	1 213 400
	estoque	2 607 600	1 826 600	1 449 200	1 630 600	2 259 000	3 273 200	3 814 800	4 625 400	5 309 000	5 838 600	6 324 400	5 312 600
1967	entradas				201 200	606 000	567 400	1 012 400	1 413 400	1 583 600	395 600	1 194 200	588 800
	saídas	510 600	613 200	713 800	511 200	822 400	623 600	528 600	524 200	751 200	1 127 800	628 400	15 200
	estoque	4 802 000	4 188 800	3 475 000	3 165 000	2 948 600	2 892 400	3 376 200	4 265 400	5 097 800	4 365 600	4 931 400	5 505 000

Fonte: Relatórios mensais de atividades - LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Vacina anti-amarílica, estoque, fluxo de entrada e saída de doses - jan/1968 a dez/1977



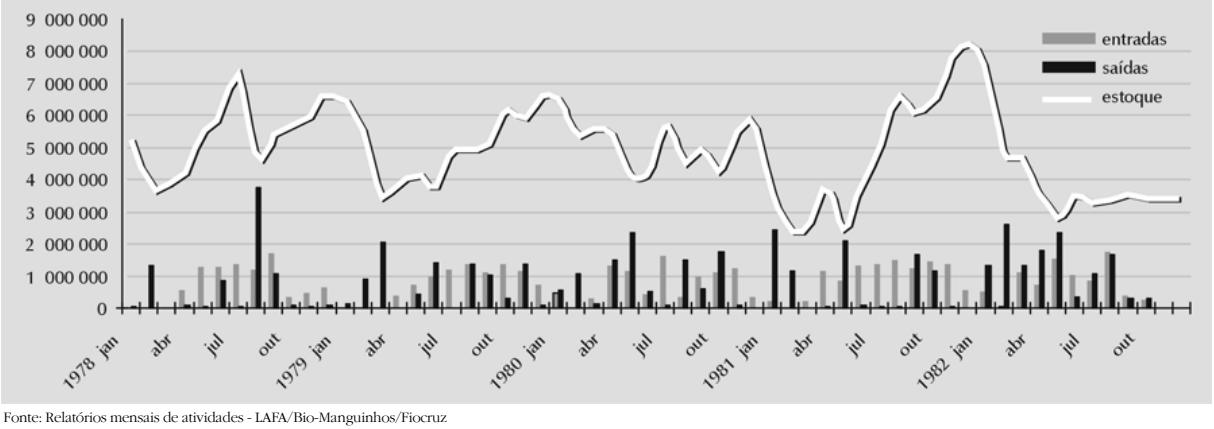
Fonte: Relatórios mensais de atividades - LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Vacinas anti-amarílicas, entradas, saídas e estoques - janeiro/1968 a dezembro/1977

		janeiro	Fevereiro	março	abril	maio	junho	julho	agosto	setembro	outubro	novembro	dezembro
1968	entradas	0	0	0	202 800	1 013 000	982 600	384 600	402 000	404 400	780 600	783 000	0
	saídas	560 000	504 600	511 200	511 800	45 600	519 000	523 800	16 400	12 600	519 000	15 600	6 800
	estoque	4 758 600	4 254 000	3 742 800	3 433 800	4 401 200	4 864 800	4 725 600	5 111 200	5 503 000	5 764 600	6 532 000	6 525 200
1969	entradas	0	0	0	0	0	202 800	400 400	203 000	0	0	393 800	0
	saídas	3 000	523 600	158 200	707 000	34 800	10 200	525 000	14 600	512 400	619 400	16 200	522 000
	estoque	6 522 200	5 998 600	5 840 400	5 133 400	5 098 600	5 291 200	5 166 600	5 355 000	4 842 600	4 223 200	4 600 800	4 078 800
1970	entradas	0	0	0	602 400	400 200	608 000	1 001 000	806 800	777 600	603 600	397 600	786 600
	saídas	535 000	15 600	16 000	483 400	743 000	222 400	926 600	543 800	231 800	671 800	568 000	213 800
	estoque	3 543 800	3 528 200	3 512 200	3 631 200	3 288 400	3 674 000	3 748 400	4 011 400	4 557 200	4 489 000	4 318 600	4 891 400
1971	entradas	199 200	722 200	114 600	307 200	195 000	608 000	1 155 200	709 600	1 110 300	0	0	0
	saídas	16 800	10 400	1 248 600	1 185 200	203 600	1 363 000	351 800	1 017 300	266 300	249 400	302 800	303 900
	estoque	4 705 400	4 513 000	3 646 200	2 395 400	2 526 200	1 353 600	1 611 400	2 134 000	2 177 500	3 000 800	2 696 000	2 390 100
1972	entradas	0	0	351 400	142 000	344 000	589 600	704 700	809 900	608 400	405 800	810 800	607 600
	saídas	3 800	31 800	592 400	44 800	27 500	661 600	716 400	408 800	840 300	1 009 000	208 700	911 400
	estoque	2 386 300	2 354 500	1 763 300	2 064 300	2 379 600	2 248 000	1 942 400	2 415 000	2 183 300	1 965 000	2 157 900	1 855 700
1973	entradas	0	1 001 200	1 016 400	1 218 200	1 624 400	1 602 000	1 622 800	1 825 200	813 400	1 220 000	0	407 600
	saídas	1 011 000	1 011 500	512 200	366 200	522 800	518 000	239 200	295 800	274 600	321 400	0	17 000
	estoque	1 439 100	803 400	1 282 000	2 138 800	2 293 200	3 717 800	5 084 600	6 620 400	7 556 400	8 045 000	0	10 014 600
1974	entradas	0	0	0	0	0	810 400	1 423 000	811 800	201 600	812 000	388 800	0
	saídas	0	0	0	0	0	9 000	622 800	515 800	587 600	664 000	514 600	10 400
	estoque	0	0	0	0	0	4 854 800	5 452 000	5 543 000	5 751 600	5 094 000	5 366 600	5 745 000
1975	entradas	0	0	0	0	588 200	507 200	405 600	1 423 800	388 800	0	869 800	0
	saídas	0	0	695 800	557 800	507 800	15 800	512 200	621 200	107 000	513 400	590 600	97 200
	estoque	0	0	5 042 600	4 477 400	3 968 800	4 539 400	4 215 800	4 372 400	5 067 200	5 140 600	4 606 600	5 217 000
1976	entradas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	957 200
	saídas	4 800	508 800	509 000	101 800	508 800	100 000	506 200	0	507 400	509 800	0	514 200
	estoque	5 212 200	4 703 400	4 194 400	4 092 600	3 583 800	3 483 800	2 977 600	2 977 600	2 470 200	1 960 400	1 960 400	1 453 200
1977	entradas	643 400	833 000	426 600	644 400	640 400	801 800	1 037 800	585 200	627 000	1 069 000	725 600	214 800
	saídas	10 000	8 800	597 200	7 800	513 200	247 800	537 800	588 200	30 400	518 200	13 600	1 926 400
	estoque	2 607 800	3 030 400	3 269 600	4 112 800	3 599 600	4 152 600	4 615 200	4 653 000	5 207 800	5 531 400	5 956 600	4 645 600

Fonte: Relatórios mensais de atividades - LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Vacina anti-amarílica, estoque e fluxo de entrada e saída de doses - jan/78 a dez/82



Fonte: Relatórios mensais de atividades - LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

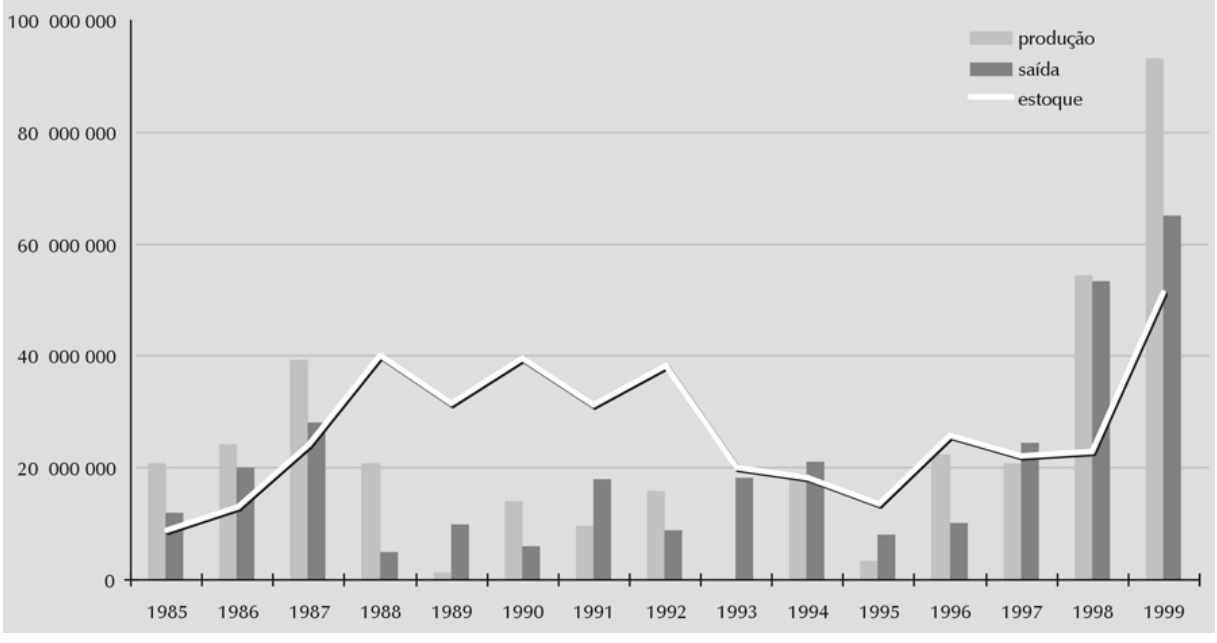
Vacina anti-amarília, entradas, saídas e estoques - janeiro/1978 a dezembro/1982

		janeiro	fevereiro	março	abril	maio	junho	julho	agosto	setembro	outubro	novembro	dezembro
1978	entradas	0	0	0	544 400	1 288 200	1 280 800	1 352 600	1 193 400	1 698 800	338 000	450 000	642 200
	saídas	28 400	1 342 400	3 400	83 600	26 400	859 400	26 200	3 742 400	1 062 150	79 450	30 000	83 600
	estoque	5 142 200	3 799 800	3 796 400	4 257 200	5 519 000	5 940 400	7 266 800	4 717 800	5 354 450	5 613 000	6 033 000	6 591 600
1979	entradas	0	0	0	397 800	730 750	964 050	1 204 050	1 379 850	1 124 550	1 374 250	1 139 000	731 100
	Saídas	115 050	916 600	2 046 400	600	430 300	1 412 800	14 450	1 353 500	1 043 800	280 250	1 381 050	70 600
	estoque	6 476 550	5 559 950	3 513 550	3 910 750	4 211 200	3 762 450	4 952 050	4 978 400	5 059 150	6 153 150	5 911 100	6 571 600
1980	entradas	484 600	0	279 350	1 307 200	1 145 600	439 000	1 639 050	347 550	981 650	1 093 000	1 216 100	353 650
	saídas	534 000	1 074 600	115 350	1 488 400	2 360 750	503 100	75 500	1 508 350	576 650	1 739 800	64 500	9 750
	estoque	6 522 200	5 447 600	5 611 600	5 430 400	4 215 250	4 151 150	5 714 700	4 553 900	4 958 900	4 312 100	5 463 700	5 807 600
1981	entradas	207 600	0	223 400	1 157 400	858 800	1 316 000	1 383 200	1 502 000	1 225 000	1 441 750	1 348 900	535 500
	saídas	2 419 400	1 158 750	9 400	47 250	2 109 500	89 700	27 900	38 200	1 646 450	1 148 950	36 900	15 200
	estoque	3 595 800	2 437 050	2 651 050	3 761 200	2 510 500	3 736 800	5 092 100	6 555 900	6 134 450	6 427 250	7 739 250	8 259 550
1982	entradas	505 200	57 100	1 114 000	735 150	1 542 150	1 041 050	861 600	1 768 100	398 050	238 450	0	0
	saídas	1 335 550	2 612 850	1 301 900	1 771 700	2 347 700	343 300	1 080 900	1 661 250	285 500	305 950	14 850	13 100
	estoque	7 429 200	4 873 450	4 685 550	3 649 000	2 843 450	3 541 200	3 321 900	3 428 750	3 541 300	3 473 800	3 458 950	3 445 850

fonte: Arquivos da Fundação Oswaldo Cruz.

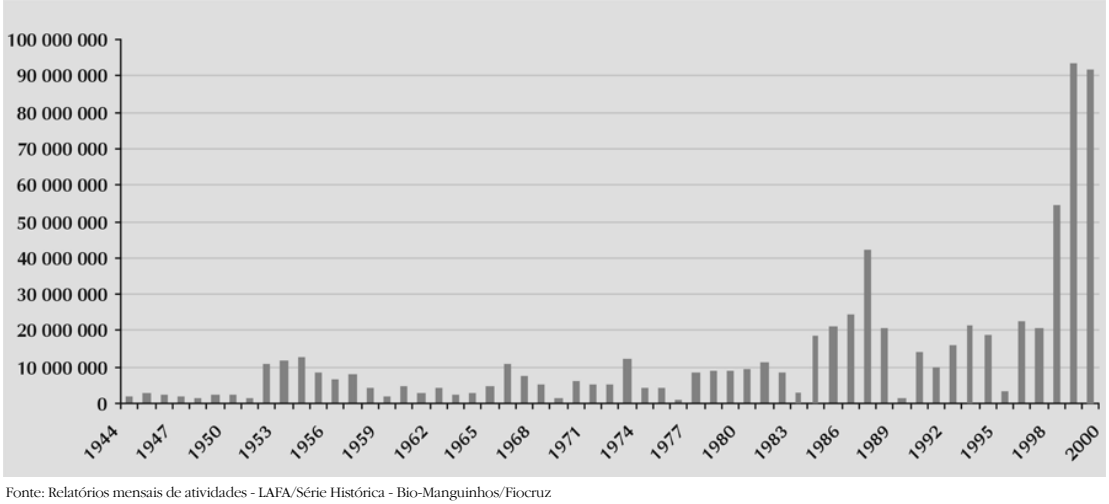
Fonte: Relatórios mensais de atividades - LAFA/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Vacina anti-amarílica, estoque e fluxo de entrada e saída de doses - 1985 a 1999



Fonte: Série Histórica - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Produção da Vacina anti-amarílica, em doses - 1944 a 2000



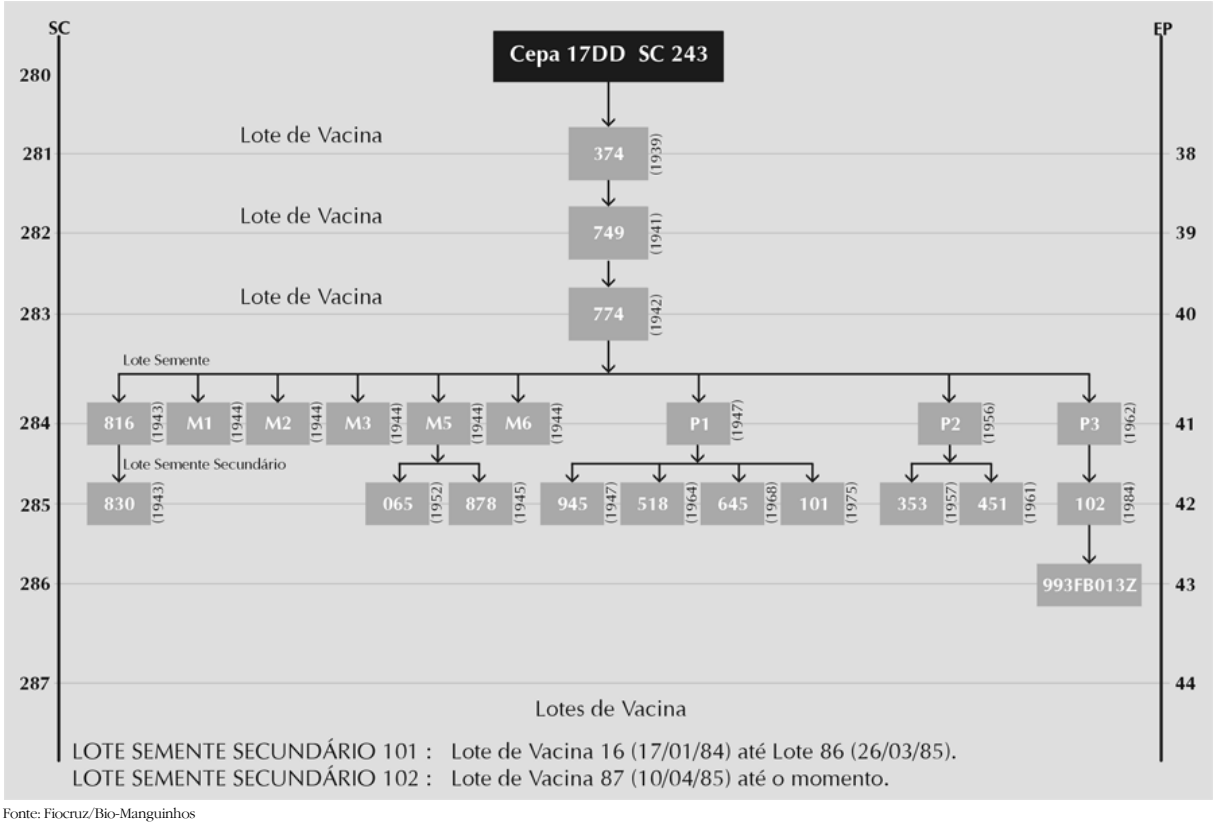
Fonte: Relatórios mensais de atividades - LAFA/Série Histórica - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Produção da Vacina anti-amarílica, em doses - 1944 a 2000

Período	Produção	Período	Produção	Período	Produção
		1960	4 879 800	1980	9 286 750
		1961	2 851 600	1981	11 199 550
		1962	4 058 000	1982	8 260 850
		1963	2 220 200	1983	2 714 050
1944	1 843 600	1964	2 935 900	1984	17 428 450
1945	2 741 850	1965	4 730 200	1985	20 892 400
1946	2 324 300	1966	10 585 200	1986	24 200 000
1947	1 931 300	1967	7 562 600	1987	39 238 600
1948	1 509 800	1968	4 953 000	1988	20 870 950
1949	2 300 200	1969	1 200 000	1989	1 356 600
1950	2 478 300	1970	5 983 800	1990	14 016 100
1951	1 274 900	1971	5 121 300	1991	9 718 000
1952	10 972 950	1972	5 374 200	1992	15 853 450
1953	11 772 100	1973	12 351 200	1993	20 000 000
1954	12 464 000	1974	4 447 600	1994	18 976 000
1955	8 534 200	1975	4 183 400	1995	3 313 000
1956	6 674 600	1976	957 200	1996	22 347 000
1957	7 841 200	1977	8 249 000	1997	20 801 000
1958	4 168 200	1978	8 788 400	1998	54 308 000
1959	2 088 600	1979	9 045 400	1999	93 244 000
				2000	18 718 000

Fonte: Relatórios mensais de atividades - LAFA/Série Histórica - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Sistema de lotes-semente de febre amarela 17 DD



Fonte: Fiocruz/Bio-Manguinhos

Notas

[1] Durante esta série de passagens, o vírus perdera a capacidade de produzir lesões viscerais ou encefalite fatal em macacos *rhesus*, mesmo quando injetado por via intracerebral, mantendo a capacidade de imunizar tanto macacos quanto humanos. Em ambas as espécies, produzia — e produz — uma infecção benigna evidenciada por circulação de pequena quantidade de vírus e, às vezes, ligeira reação febril. Em camundongos injetados por via intracerebral, o vírus ainda provoca encefalite mortal, mas com período de incubação aumentado.

[2] Sendo necessárias páginas adicionais, recebiam as letras A, B, C etc.,. após o número da página alterada. As páginas revisadas eram rubricadas pelo diretor do laboratório, e as preexistentes, marcadas com 'substituído em (data)', eram guardadas no final do manual, na seção "Trechos substituídos" (pp. 1-2).

[3] As histórias e características dessas subamostras seriam descritas por Fox e Penna (1943, pp. 152-72). Em seu *Diário*, Penna registra em 25 de março de 1942 que estava trabalhando na reorganização de todos os registros de estoque de vacinas por subamostra, em vez de por tipo de vacina, como era feito.

[4] *Manual da vacina*, pp. 4-A, 4-B, 4-C; *Diário de H. Penna* (1942).

[5] J. H. Bauer a Soper, em 5.11.1941; J. H. Bauer a Taylor, em 14.10.1942 (em resposta à carta nº A-358, de 2.10); J. H. Bauer a Kerr, aos cuidados de Taylor (ambos no Rio de Janeiro), em 12.11.1942, em resposta à carta nº A-384, de 26.10.

[6] Em fevereiro de 1945, Penna teve de retirar do estoque o lote 858, "por ter o *rhesus* de controle manifestado paralisia do trem posterior, 24 dias após a injeção, vindo a falecer dez dias mais tarde. Foi feita tentativa de isolamento de vírus do seu cérebro". "Relatório de atividades da Seção de Vacina de janeiro a dezembro de 1945".

[7] "Resumo de atividades do laboratório" em 1947. Em setembro, Penna escrevia: "O lote 945, considerado como "semente-secundário", é originário do "semente-primário" nº 1, e destina-se a substituir, eventualmente, o lote 878, com o qual vêm sendo preparados todos os lotes em uso. Com o fim de se conhecer o poder antigênico dessa nova amostra, algumas provas deverão ser realizadas no campo, dentro em breve." Em outubro, registrou que havia sido preparado um lote de vacina com "semente" 945, e enviado para campo, a fim de se testar o seu poder antigênico.

[8] "Resumo das atividades do laboratório" em 1948. Em julho de 1949, foi preparado o milésimo lote de vacina do laboratório do Rio, iniciando-se nova série de numeração, a começar do 1, para evitar um número muito grande de algarismos nos lotes subseqüentes. As vacinas pertencentes à nova série seriam acondicionadas em ampolas de outro tipo. "Resumo das atividades do laboratório" em 1949.

[9] A fórmula usada na preparação da solução de Tyrode era: NaCl (8,0 g); KCL (0,2 g); CaCl2 (0,2 g); MgCl2 (0,1 g); NaH2PO4 (0,05 g); NaHCO3 (1,0 g); glicose (1,0 g); água para completar (1.000 c.c.).

[10] Na ocasião de semear a passagem subseqüente, porções de líquido sobrenadante eram inoculadas em caldo glicosado e num grupo de seis camundongos. O caldo era incubado a 37ºC e observado diariamente para ver se cresciam bactérias, e os camundongos eram observados para ver se apresentavam encefalite. O resto do líquido sobrenadante era recolhido, misturado com partes iguais de soro humano normal, distribuído em ampolas, em volumes de 3 c.c., e dessecado. *Manual da vacina*, pp. 6-7.

[11] Escolhiam-se para 'semente' aqueles que apresentassem "título" superior a 10.000 DML. O número usado para expressar o título, isto é, a concentração e potência dos vírus existentes na vacina, indica a diluição na qual volumes de 0,03 c.c. inoculados por via intracerebral em camundongos matam 50% desses animais. Explicaremos melhor isso adiante. Os lotes semente podiam ser usados em diluições de, pelo menos, 1:20 para inoculação dos embriões. *Manual da vacina*, p. 4-C; Penna, 1956, pp. 71-2.

[12] "Novos lotes semente primários e secundários devem ser testados para viscerotropismo, imunogenicidade e neurotropismo em um grupo de dez macacos. No teste de neurotropismo, os macacos inoculados com o vírus do lote semente devem ser comparados com grupo similar de dez macacos injetados com um vírus de referência". Nestes testes têm de ser usados exemplares de *Macaca mulatta* (o *rhesus*) ou *Macaca fascicularis* (o *cynomolgus*) *WHO. Expert Committee on Biological Standardization*, 1998, p. 37.

[13] Em 1942, Penna experimentou também injetar 0,03 c.c. em vez de 0,06 c.c. de inóculo, para diminuir a mortalidade dos embriões por traumatismo. O vírus seria concentrado para compensar a redução do volume de inóculo.

[14] O aparelho desenvolvido por Penna, para abrir ovo por ovo, foi aperfeiçoado por Pickels (1942, pp. 224-8).

[15] Segundo Penna, em 1956 (p. 73) "a percentagem de contaminação nos últimos dez lotes de ovos abertos no laboratório do Rio de Janeiro, compreendendo 112 sublotes de embriões, foi de 10.9. O número médio de embriões por sublote foi de noventa." Bastões gram-negativos eram os contaminantes mais comuns, mas ainda não se sabia se provinham das cascas ou do interior dos ovos.

[16] Nome comercial da alumina cristalizada, obtida pela fusão da bauxita em forno elétrico, usada como abrasivo ou refratário.

[17] Em fluidos, processo de transmissão de calor que é acompanhado por um transporte de massa efetuado pelas correntes que se formam no seio do fluido.

[18] As instalações do quarto frio, que não estavam funcionando devidamente, foram reformadas em dezembro. Com novas válvulas de maior capacidade, um sistema de degelo inteiramente modificado e um cano de sucção de maior calibre, obteve-se um degelo que Penna qualificou de "perfeito e a temperatura de cerca de trinta graus abaixo de zero pode ser mantida, mesmo nos dias de maior calor". Nem todo o material existia na praça, o que obrigou à confecção de peças substitutas. "Resumo das atividades do laboratório" em 1949.

[19] Era importante que o azoto fosse de boa qualidade, isto é, sem oxigênio. Em casos excepcionais, em feriados, por exemplo, o segundo período podia ser prolongado por mais 24 horas, mas no quarto frio. Podia haver um terceiro período

de 24 horas com P_2O_5 quando a substância desse mostras de estar muito úmida ao ser retirada.

[20] O aparelho era o resultado da adaptação de um motor de máquina de costura Singer a um cabo flexível de broca de dentista com um pequeno esmeril em forma de disco na extremidade (*Manual da vacina*, p. 42-B). Os padrões para a manufatura e controle da vacina contra a febre amarela estabelecidos pelas Nações Unidas em 1945 recomendavam que fosse afixado em cada ampola um rótulo com informações sobre a vacina. Os rótulos eram danificados ou se desprendiam durante o transporte das ampolas em recipientes com gelo. As do laboratório do Rio de Janeiro passaram a ser marcadas na fábrica com o número de lote da vacina, em grupos de 1.050, com tinta especial aplicada quente (Penna, 1956, p. 77).

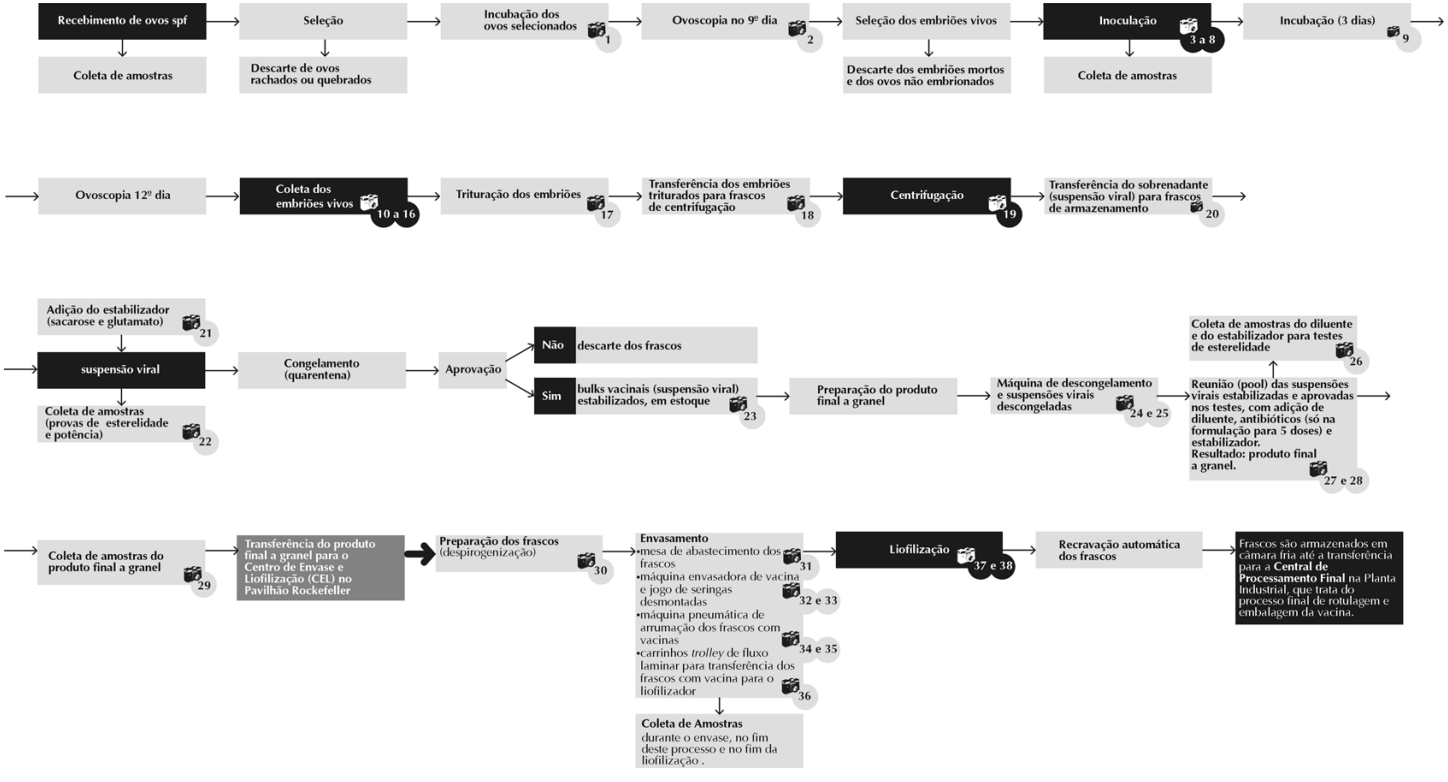
[21] O dessecante químico só participava nesta fase do processo: um frasco com essa substância higroscópica era conectado a uma das saídas, que funcionava como escapamento para evitar o aumento na pressão do ar pelo aquecimento do nitrogênio durante a operação de selagem.

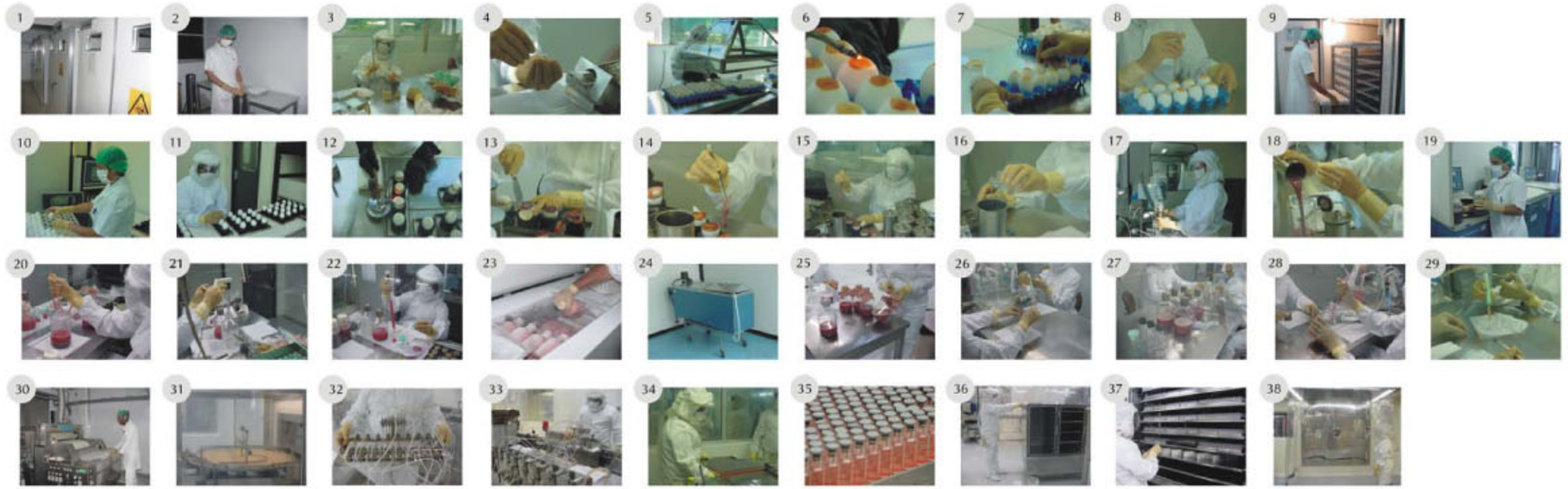
[22] Para se analisar variações nos resultados de dosagens, anotavam-se os seguintes dados nos protocolos: 1. nome da pessoa que fez a dosagem; 2. idade dos camundongos; 3. subcepa dos camundongos; 4. descrição detalhada do material dosado; 5. tempo gasto em reidratar o material; 6. descrição do soro usado no diluente; 7. PH do diluente; 8. temperatura do diluente; 9. condições atmosféricas durante o período de observação dos camundongos, especialmente a temperatura na sala dos camundongos; 10. quaisquer acontecimentos fora do comum observados durante a dosagem, desde a abertura dos recipientes até a ocasião de descartar os camundongos. Os camundongos, da raça Swiss, com 21 dias ou mais, eram mantidos em caixas de ferro galvanizado, com seis animais em cada caixa, e observados diariamente. *Manual da vacina*, p. 47-B, C.

[23] Artigo XI da "International Sanitary Convention for Aerial Navigation", 1944, estabelecido pela United Nations Relief and Rehabilitation Administration.

[24] Segundo o *Manual da vacina*, a diluição usada no campo devia ser tal que o volume *standard* de 0,5 c.c. contivesse, pelo menos, 1.000 DML. Em dezembro de 1943, Penna escreveu: "Título de vacina satisfatório significa dizer que os controles efetuados determinam título de vírus alto o bastante para permitir que cada pessoa vacinada receba pelo menos 1.000 MLD para camundongos, quando a diluição utilizada for de 1:100". Com muita freqüência, porém, as vacinas chegavam às pessoas com título de 1:6.000 no momento em que eram administradas, o que correspondia a aproximadamente 200.000 LD_{50} por ml. "Resumo de atividades da Seção de Vacina", 1/1-31/12-43; Penna, 1956, p.86.

Fluxograma


Recebimento de ovos spf
Coleta de amostras
Seleção
Descarte de ovos rachados ou quebrados
Incubação dos ovos selecionados 1
Ovoscopia no 9º dia 2
Seleção dos embriões vivos
Descarte dos embriões mortos e dos ovos não embrionados
Inoculação 3 a 8
Coleta de amostras
Incubação (3 dias) 9
Ovoscopia 12º dia
Coleta dos embriões vivos 10 a 16
Trituração dos embriões 17
Transferência dos embriões triturados para frascos de centrifugação 18
Centrifugação 19
Transferência do sobrenadante (suspensão viral) para frascos de armazenamento 20
Adição do estabilizador (sacarose e glutamato) 21
suspensão viral
Coleta de amostras (provas de esterelidade e potência) 22
Congelamento (quarentena)
Aprovação
Não descarte dos frascos
Sim bulks vacinais (suspensão viral) estabilizados, em estoque 23
Preparação do produto final a granel
Máquina de descongelamento e suspensões virais descongeladas 24 e 25
Coleta de amostras do diluente e do estabilizador para testes de esterelidade 26
Reunião (pool) das suspensões virais estabilizadas e aprovadas nos testes, com adição de diluente, antibióticos (só na formulação para 5 doses) e estabilizador.
Resultado: produto final a granel. 27 e 28
Coleta de amostras do produto final a granel 29
Transferência do produto final a granel para o Centro de Envase e Liofilização (CEL) no Pavilhão Rockefeller
Preparação dos frascos (despirogenização) 30
Envasamento
•mesa de abastecimento dos frascos 31
•máquina envasadora de vacina e jogo de seringas desmontadas 32 e 33
•máquina pneumática de arrumação dos frascos com vacinas 34 e 35
•carrinhos trolley de fluxo laminar para transferência dos frascos com vacina para o liofilizador 36
Coleta de Amostras
durante o envase, no fim deste processo e no fim da liofilização .
Liofilização 37 e 38
Recravação automática dos frascos
Frascos são armazenados em câmara fria até a transferência para a Central de Processamento Final na Planta Industrial, que trata do processo final de rotulagem e embalagem da vacina.



Pavilhão Henrique Aragão
que abriga o laboratório de vacina
contra a febre amarela da
Fundação Oswaldo Cruz
Reprodução/Coc/Fiocruz

Laboratório de vacina contra a febre amarela